

## 明 細 書

マイクロシステム、並びに、微小開口膜、及び生体分子間相互作用解析装置とその解析方法

5

## 技術分野

本発明は、微小な液体流路を流れる液体の流れを制御するマイクロシステム、並びに、生体分子間相互作用を1分子レベルで検出、定量するための微小開口膜、及び生体分子間相互作用解析装置とその解析方法に関する。

10

## 背景技術

近年のナノテクノロジーの進歩により、ガラスなどのチップ上にミクロンオーダーの液体流路を形成し、この液体流路に試料を流すことによって、試料の分析、又は反応などを行わせるマイクロシステムの開発が進められている。このようなマイクロシステムは、試料が少量であっても試料の分析が可能であるなどの利点を有しており、非常に注目を浴びている。

ところが、このようなマイクロシステムにおいては、試料の流れを制御するためのバルブを液体流路に設けることが難しく、試料の流れを制御すること困難であるという問題があった。

この問題を解決する手段として、特開2002-163022号公報に、マイクロシステムの微小流路を流れる液体に、外部レーザーなどからの熱の刺激によりゾル-ゲル転移する物質を添加し、微小流路上の所望の箇所に刺激を与え、流体をゲル化させて流れを制御する方法が開示されている。この方法によれば、複雑なバルブ構造を用いることなく、流体の流れを停止し、また、流量や流速を簡単に調整することができる。そして、流路の一部に分岐を設け、分岐後の流路に対し選択した流路において液体に刺激を与えれば、その物質のゲル化によってその流路が閉塞されることによって流体の流れる方向を選択することができる。そして、刺激を停止することで、その物質はゾル化して、再びその流路が開放されるものである。

しかしながら、上記の方法によれば、流体に与える刺激の量が適正でない場合において、刺激の量が少なすぎてゲル化が適切に行われず流路を閉塞することができない、または、刺激の量が多すぎて液体が必要以上に熱せられ、その後のゾル化に時間を要してしまうといった問題があった。

- 5      そこで本発明の第1の目的は、上記の問題を解決することであり、流路における液体の流れを制御するために与える刺激の量を適正值にすることができるマイクロシステムを提供することにある。

- また、上記の方法は、従来の微細加工技術を用いて基板にあらかじめ液体流路を形成し、その形成された液体流路を流体が流れるものである。そして、この液体流路を形成する方法としては、例えば、基板を化学反応によるエッチングや光硬化性樹脂、熱硬化性樹脂による型抜きによるものがある。この方法では液体流路の形成に複雑なプロセスを要し、また時間もかかるという課題があった。また、この方法では、ゲル化により液体流路を流れる流体の流れを止めたり、流量を調節することは可能であるが、あくまで既存の液体流路しか利用できず、液体流路自体を新たに形成したり、消滅させたりすることはできず、目的ごとに異な
- 10      た流路形状を有する液体流路を準備する必要があるという課題があった。
- 15      そこで、本発明の第2の目的は、壁やバルブの構造体を自由に形成することにより、液体流路を任意の位置で形成し消滅することができるマトリックス型可変液体流路およびそれを制御することができるシステムを提供するものである。また、あらかじめ基板に液体流路を形成する必要がないマトリックス型可変液体流路およびそれを制御することができるシステムを提供するものである。

一方、従来の生体分子間相互作用を1分子レベルで検出、定量する方法として、主として以下の2つの方法がある。

- 1つは、図35に示すように、ガラス301と水溶液302の界面303にレーザー光
- 25      304を入射して全反射させ、水溶液302の界面303に発生するエバネッセント場305を利用して、蛍光性生体分子306をイメージングする方法である。エバネッセント場305は、界面303から浸入長150nmで減衰するので局所励起が可能である。一方の蛍光性生体分子306をガラス301に固定し、他方の生体分子を別の蛍光波長の蛍光分子で標識して水溶液302に加えると、これら生体分子同士の結合、解

離（分子間相互作用）を超高感度カメラ307で撮影することが可能である。この生体分子の1分子蛍光イメージング法は、発明者らによって1995年に開発され（Funatsu, T. et al., (1995) Nature 374, 555-559）、さまざまな成果を収めてきた。しかし、1. 水溶液302中の蛍光性生体分子306の濃度を50 nM以下  
5 にしないと1分子観察が困難であること、2. 蛍光性生体分子がガラス301に非特異的に吸着し、分子間相互作用の検出が困難であるという問題点をかかえており、1分子計測できる生体分子相互作用は限られていた。

これらの問題が発生する理由は以下のとおりである。全反射により発生するエバネッセント場305は、界面303に垂直な方向に150 nmの局所励起を実現して  
10 いるが、平行な方向については局所化していないので、水溶液中302の蛍光性生体分子306の濃度を50 nM以下にしなければ超高感度カメラ306に接続された光学顕微鏡の分解能（約250 nm）の範囲で、個々の蛍光性生体分子306をイメージングすることができない。また、蛍光性生体分子306が発した蛍光308は、超高感度カメラ307まで伝播するあいだに回折の影響を受け、試料面で直径約25  
15 0 nmに相当する大きさに広がってしまう。そのため、個々の蛍光性生体分子306を識別するためには、ガラス301に固定する蛍光性生体分子306の間隔を約250 nmよりも大きくしなければならない。そのため、ガラス301上に固定した蛍光性生体分子306が占める面積の割合は0.1%以下と小さくなり、水溶液302中に加えた生体分子のガラス301への非特異的吸着が問題となるのである。これ  
20 らの問題は、蛍光性生体分子306を励起する領域をさらに小さくし、それらを超高感度カメラ307に接続された光学顕微鏡の分解能よりも離れた位置に配置することによって解決できると期待される。

生体分子間相互作用を1分子レベルで検出する2つめの方法は、蛍光相関分光法（FCS; Fluorescence Correlation Spectroscopy）である。これは、図3  
25 6に示すように、レーザービーム311を開口数の大きい対物レンズ312で回折限界まで絞込み、その中を通過する蛍光性生体分子313の蛍光強度のゆらぎを測定することにより、個々の蛍光性生体分子313の蛍光強度と拡散定数を求める方法である（Eigen M. and Rigler, R. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 5740-5747, 特表平11-502608号（特願平6-51570号）公報）。

レーザービーム311の焦点314の蛍光315だけを検出するために、レーザービーム311の結像位置にピンホールを置く共焦点光学系が用いられている。2種類の蛍光315の相関をとれば2種類の蛍光性生体分子313の分子間相互作用を解析することも可能である。この方法は、蛍光クロス相関分光法（FCCS；fluorescence  
5 Cross-correlation Spectroscopy）と呼ばれる（Rigker, R., Z. et al., (1998) Fluorescence cross-correlation - a new concept for polymerase chain reaction. J. Biotechnol. 63: 97-109）。

この方法においても、照射領域が光の回折限界程度に広がるため、蛍光性生体分子313の濃度を100 nM程度までしか上げることができなかった。より高濃  
10 度で生体分子間相互作用を観察するために、光の回折限界を超える局所励起が望まれていた。

そこで、本発明の第3の目的は、上記の問題を解決することであり、励起光の照射領域を励起光の波長よりも小さくすることを実現し、生体分子間相互作用を1分子レベルで高感度で検出、定量することを可能にする微小開口膜、及び生体  
15 分子間相互作用解析装置とその解析方法を提供することを目的とする。

#### 発明の開示

本発明の請求項1記載のマイクロシステムは、前記第1の目的を達成するために、基板に形成された液体流路を流れる液体に刺激を付与する刺激付与手段を備  
20 え、この刺激付与手段からの刺激によって前記液体の流れを制御するように構成したマイクロシステムにおいて、前記刺激付与手段が前記液体に付与する刺激の量を電気的に制御する制御手段を備えたことを特徴とする。

この構成によれば、制御手段によって刺激付与手段が前記液体に付与する刺激の量を電気的に制御することにより、刺激の量を適正值にすることが可能になる  
25 。

本発明の請求項2記載のマイクロシステムは、請求項1において、前記刺激付与手段は熱源又は光源であって、前記刺激の量を検知する刺激検知手段を備え、この刺激検知手段からの信号に基づき前記制御手段が前記刺激付与手段を制御するように構成したことを特徴とする。

この構成によれば、刺激の量を適正值にすることができる。

本発明の請求項 3 記載のマイクロシステムは、請求項 2 において、前記熱源はマイクロヒーターであることを特徴とする。

この構成によれば、確実に液体に刺激を与えることができる。

- 5 本発明の請求項 4 記載のマイクロシステムは、請求項 2 において、前記刺激検知手段は前記液体流路に設けられた熱センサーであることを特徴とする。

この構成によれば、確実に刺激付与手段が液体に与えた刺激の量を検知することができる。

- 10 本発明の請求項 5 記載のマイクロシステムは、請求項 4 において、前記熱センサーは熱電対であることを特徴とする。

この構成によれば、熱センサーを簡単に構成することができる。

本発明の請求項 6 記載のマイクロシステムは、請求項 4 において、前記熱センサーは熱感応性半導体又は赤外線感応性センサーであることを特徴とする。

この構成によれば、確実に刺激の量を検知することができる。

- 15 本発明の請求項 7 記載のマイクロシステムは、請求項 2 において、前記光源は前記基板に設置された発光素子であることを特徴とする。

この構成によれば、光源を簡単に構成することができる。

本発明の請求項 8 記載のマイクロシステムは、請求項 7 において、前記発光素子は前記基板に埋め込まれたことを特徴とする。

- 20 この構成によれば、発光素子を液体流路の近傍に配することができ、確実に液体に刺激を与えることができる。

本発明の請求項 9 記載のマイクロシステムは、請求項 7 において、前記発光素子は前記基板の外に配置されたことを特徴とする。

- 25 この構成によれば、基板を使い捨てにしても、発光素子は繰り返し使用することができる。

本発明の請求項 10 記載のマイクロシステムは、請求項 9 において、前記発光素子からの光を導入する光導入路を前記液体流路が形成された前記基板の面と水平に形成したことを特徴とする。

この構成によれば、発光素子からの光を効率良く液体流路へ導入することがで

きる。

本発明の請求項 1 1 記載のマイクロシステムは、請求項 7 において、前記発光素子は複数個設置されたことを特徴とする。

5 この構成によれば、液体通路の異なる複数の箇所において、刺激を付与することができ。

本発明の請求項 1 2 記載のマイクロシステムは、請求項 1 において、前記液体にエネルギーを付与するエネルギー付与手段と、このエネルギー付与手段からのエネルギーによって変化を生じる物質の変化を検知する変化検知手段を備え、この変化検知手段からの信号に基づき前記制御手段が前記刺激付与手段を制御する  
10 ように構成したことを特徴とする。

この構成によれば、エネルギー付与手段からのエネルギーによって変化を生じる物質の変化に基づき液体の流れを制御することによって、その物質が含まれる液体のみを容易に取り分けることができる。

本発明の請求項 1 3 記載のマイクロシステムは、請求項 1 2 において、前記エネルギー付与手段からのエネルギーを導入するエネルギー導入路を前記基板の面  
15 と水平に形成したことを特徴とする。

この構成によれば、エネルギー付与手段からのエネルギーを効率良く液体流路へ導入することができる。

本発明の請求項 1 4 記載のマイクロシステムは、請求項 1 2 において、前記変化検知手段は蛍光検知素子又は受光素子であることを特徴とする。  
20

この構成によれば、確実にエネルギー付与手段からのエネルギーによって変化を生じる物質の変化を検知することができる。

本発明の請求項 1 5 記載のマイクロシステムは、請求項 1 4 において、前記蛍光検知素子又は前記受光素子は前記基板の面と水平に配置されたことを特徴とする。  
25

この構成によれば、エネルギー付与手段からのエネルギーによって変化を生じる物質の変化を液体流路の側面から検出することができる。

本発明の請求項 1 6 記載のマイクロシステムは、請求項 1 4 において、前記蛍光検知素子又は前記受光素子は前記液体流路の上方に配置されたことを特徴とす

る。

この構成によれば、エネルギー付与手段からのエネルギーによって変化を生じる物質の変化を液体流路の上方から検出することができる。

- 5      本発明の請求項 17 記載のマイクロシステムは、請求項 1 において、前記基板を載置する載置台を備え、この載置台に前記基板の位置を決める位置決め手段を備えたことを特徴とする。

この構成によれば、位置決め手段によって載置台の正しい位置に簡単に基板を載置することができ、特に、基板を使い捨てにした場合において正確に基板を載置する際の位置あわせの手間を省くことができる。

- 10      本発明の請求項 18 記載のマトリックス型可変液体流路は、前記第 2 の目的を達成するために、基板上に複数の刺激感応部材を二次元マトリックス状に配置したことを特徴とする。

- この構成によれば、二次元マトリックス状に配置された刺激感応部材を刺激することにより任意の位置で、可逆的にゾルーゲル転移により壁やバルブの構造体を構成することができるので、液体流路の作製が容易である。また、刺激感応部材を刺激するのでゾルーゲル転移を起こす物質のゲル化速度が速くなる。さらに、流路形状を自由に変更できるので、異なった流路形状を有する液体流路の準備が不要となる。刺激感応部材としては、例えば、刺激により発熱する金属片を用いることができ、この金属片としてはチタン、クロムなどを用いることができる。
- 15      。
- 20      そして、生体反応を考慮した場合は、生体と反応しないチタンを用いるのが好ましい。

本発明の請求項 19 記載のマトリックス型可変液体流路は、請求項 18 において、前記基板上の刺激感応部材が間隔をおいて配列されていることを特徴とする。

- 25      この構成によれば、刺激感応部材に間隔があることで任意の位置でのゲル化が容易となる。

本発明の請求項 20 記載のマトリックス型可変液体流路は、請求項 19 において、前記刺激感応部材の大きさが  $2 \mu\text{m}$  以上  $20 \mu\text{m}$  以下であることを特徴とする。

この構成によれば、刺激感応部材を刺激し、この刺激感応部材の大きさに対応させてゾルーゲル転移を起こす物質をゲル化させることができる。そして、刺激感応部材の大きさが  $2\ \mu\text{m}$  以上  $20\ \mu\text{m}$  以下であるのは、 $2\ \mu\text{m}$  未満ではゲル化による壁やバルブの構造体の厚さが薄くなるので好ましくなく、 $20\ \mu\text{m}$  を超えるとゲル化による壁やバルブの構造体の厚さが厚くなり、特に厚い壁やバルブの構造体が要求される以外は必要がないからである。

本発明の請求項 21 記載のマトリックス型可変液体流路は、請求項 19 において、前記刺激感応部材が  $2\ \mu\text{m}$  以上  $20\ \mu\text{m}$  以下の間隔で配列されていることを特徴とする。

10 この構成によれば、刺激によりゾルーゲル転移を起こす物質がゲル化する領域は刺激感応部材より大きく、刺激感応部材を適当な間隔で空けておいてもゲル化領域が接続するので壁やバルブの構造体を形成することができる。そして、刺激感応部材の間隔が  $2\ \mu\text{m}$  以上  $20\ \mu\text{m}$  以下であるのは、 $2\ \mu\text{m}$  未満では、間隔が狭く、 $20\ \mu\text{m}$  を超えると、ゲル化領域が接続し難くなるからである。

15 本発明の請求項 22 記載のマトリックス型可変液体流路明は、請求項 19 において、前記刺激感応部材が蒸着、スパッタリング、化学気相成長 (CVD)、めっき、プラズマ重合、又はスクリーン印刷により形成されたことを特徴とする。

この構成によれば、蒸着、スパッタリング、化学気相成長 (CVD)、めっき、プラズマ重合、スクリーン印刷を用いることにより、容易に刺激感応部材を基板上に形成することができる。

20 本発明の請求項 23 記載のマトリックス型可変液体流路は、請求項 18 において、前記刺激感応部材に、電圧をかけることまたは光を照射することにより刺激を付与するように構成したことを特徴とする。

25 この構成によれば、前記刺激感応部材に電圧をかけることまたは光を照射することにより刺激を付与するように構成されているので、刺激感応部材の温度を調整でき、ゾルーゲル転移を容易に起こさせることができる。

本発明の請求項 24 記載のマトリックス型可変液体流路システムは、基板上に複数の刺激感応部材を二次元マトリックス状に配置したマトリックス型可変液体流路と、前記基板上の物質を検出する検出手段と、前記刺激感応部材に刺激を与



える刺激付与手段と、前記検出手段からの信号に基づき前記刺激付与手段を制御する制御手段とを備えたことを特徴とする。

この構成によれば、刺激付与手段により、二次元マトリックス状に配置された刺激感応部材が刺激され、その刺激感応部材に対応する位置で、可逆的にゾルーゲル転移により壁やバルブの構造体を構成することができるので、液体流路の作製が容易となる。また、刺激感応部材を刺激するのでゾルーゲル転移を起こす物質のゲル化速度が速くなる。そして、この刺激付与手段を制御することにより基板上の流路形状を容易に変更できるので、異なった流路形状を有する液体流路の準備が不要となる。さらに、基板上の任意の位置で物質の検出ができ、目的とする試料物質の分離や、分析が容易になる。刺激感応部材としては、例えば、刺激により発熱する金属片を用いることができ、この金属片としてはチタン、クロムなどを用いることができる。そして、生体反応を考慮した場合は、生体と反応しないチタンを用いるのが好ましい。

本発明の請求項 2 5 記載のマトリックス型可変液体流路システムは、請求項 2 4 において、前記基板上の刺激感応部材が間隔をおいて配列されていることを特徴とする。

この構成によれば、刺激感応部材に間隔があることにより任意の位置でのゲル化が容易となる。そして、基板上の流路形状を容易に変更できるので、基板上の任意の位置で物質の検出ができ、目的とする試料物質の分離や、分析が容易になる。

本発明の請求項 2 6 記載のマトリックス型可変液体流路システムは、請求項 2 5 において、前記刺激感応部材の大きさが  $2 \mu\text{m}$  以上  $20 \mu\text{m}$  以下であることを特徴とする。

この構成によれば、刺激感応部材を刺激し、この刺激感応部材の大きさに対応させてゾルーゲル転移を起こす物質をゲル化させることができる。そして、刺激感応部材の大きさが  $2 \mu\text{m}$  以上  $20 \mu\text{m}$  以下であるのは、 $2 \mu\text{m}$  未満ではゲル化による壁やバルブの構造体の厚さが薄くなるので好ましくなく、 $20 \mu\text{m}$  を超えるとゲル化による壁やバルブの構造体の厚さが厚くなり、特に厚い壁やバルブの構造体が要求される以外には必要がないからである。そして、このような構成によ

り、基板上の流路形状を容易に変更できるので、基板上の任意の位置で物質の検出ができ、目的とする試料物質の分離や、分析が容易になる。

本発明の請求項 27 記載のマトリックス型可変液体流路システムは、請求項 25 において、前記刺激感応部材が  $2\ \mu\text{m}$  以上  $20\ \mu\text{m}$  以下の間隔で配列されていることを特徴とする。

この構成によれば、刺激によりゾルーゲル転移を起こす物質がゲル化する領域は刺激感応部材より大きく、刺激感応部材を適当な間隔で空けておいてもゲル化領域が接続するので壁やバルブの構造体を形成することができる。そして、刺激感応部材の間隔が  $2\ \mu\text{m}$  以上  $20\ \mu\text{m}$  以下であるのは、 $2\ \mu\text{m}$  未満では、間隔が狭く、 $20\ \mu\text{m}$  を超えると、ゲル化領域が接続し難くなるからである。そして、このような構成により、基板上の流路形状を容易に変更できるので、基板上の任意の位置で物質の検出ができ、目的とする試料物質の分離や、分析が容易になる。

本発明の請求項 28 記載のマトリックス型可変液体流路システムは、請求項 25 において、前記刺激感応部材が蒸着、スパッタリング、化学気相成長 (CVD)、めっき、プラズマ重合、又はスクリーン印刷により形成されたことを特徴とする。

この構成によれば、蒸着、スパッタリング、化学気相成長 (CVD)、めっき、プラズマ重合、又はスクリーン印刷を用いることにより、容易に刺激感応部材を基板上に形成することができる。そして、このような構成により、システムを安価にすることができる。

本発明の請求項 29 記載のマトリックス型可変液体流路システムの発明は、請求項 24 において、前記刺激付与手段として、前記刺激感応部材に電圧をかけることまたは光を照射することにより刺激を付与するように構成したことを特徴とする。

この構成によれば、前記刺激付与手段として、刺激感応部材に電圧をかけることまたは光を照射することにより刺激を付与するように構成されているので、刺激感応部材の温度を調整でき、ゾルーゲル転移を容易に起こさせることができる。そして、このような構成により、基板上の流路形状を容易に変更できるので、

基板上的の任意の位置で物質の検出ができ、目的とする試料物質の分離や、分析が容易になる。

本発明の請求項 30 記載の微小開口膜は、前記第 3 の目的を達成するために、微小開口が設けられた光を透過しない薄膜からなることを特徴とする。

- 5     この構成によれば、微小開口の最大開口幅を励起光の波長よりも小さくし、この微小開口に励起光を照射すれば、この微小開口からエバネッセント場が生じ、このエバネッセント場を用いることで、励起光の波長より小さい領域で励起光を蛍光性生体分子に照射することが可能になる。

- 10    本発明の請求項 31 記載の微小開口膜は、請求項 30 において、前記薄膜は透明な基板に結合されていることを特徴とする。

この構成によれば、基板に薄膜を支持することで薄膜の製造性と取り扱い性を向上させることができる。また、基板は透明なので励起光の透過を妨げることがない。

- 15    本発明の請求項 32 記載の微小開口膜は、請求項 30 において、前記微小開口は複数設けられ略等間隔に配列されていることを特徴とする。

- この構成によれば、複数の微小開口のうちの任意の微小開口において蛍光性生体分子の蛍光を観察することができるので、蛍光検出手段の位置合わせが容易になる。また、微小開口の間隔を蛍光検出手段の分解能と同じか又は蛍光検出手段の分解能よりも大きくすれば、それぞれの微小開口によって励起された個々の蛍光性生体分子の蛍光を分離して、1 分子レベルで生体分子間相互作用を検出することができる。
- 20

本発明の請求項 33 記載の微小開口膜は、請求項 30 において、前記微小開口の最大開口幅は 200 nm 以下であることを特徴とする。

- 25    この構成によれば、微小開口の最大開口幅を励起光の波長よりも小さくすることができる。

本発明の請求項 34 記載の生体分子間相互作用解析装置は、励起光を発生する励起光発生手段と、最大開口幅が前記励起光の波長よりも小さい微小開口が設けられた光を透過しない薄膜からなる微小開口膜と、蛍光を検出する蛍光検出手段とを備えたことを特徴とする。

この構成によれば、最大開口幅が励起光の波長よりも小さい微小開口膜の微小開口に励起光発生手段からの励起光を照射し、この微小開口に生じるエバネッセント場を用いることで励起光の波長より小さい領域で励起光を蛍光性生体分子に照射することができ、この蛍光性生体分子から発せられる蛍光を蛍光検出手段で  
5 検出することができる。また、励起光の波長より小さい領域で励起光を蛍光性生体分子に照射することによって、蛍光性生体分子の水溶液中の濃度を高くすることができ、さらに、蛍光性生体分子のガラス面などへの非特異的吸着の影響を抑えることができるので、生体分子間相互作用の検出、定量を確実に行うことができる。

- 10 本発明の請求項 3 5 記載の生体分子間相互作用解析装置は、請求項 3 4 において、前記微小開口は複数設けられ等間隔に配列されているとともに、前記微小開口の間隔は前記蛍光検出手段の分解能と同じか又は前記蛍光検出手段の分解能よりも大きいことを特徴とする。

この構成によれば、複数の微小開口のうちの任意の微小開口において蛍光性生  
15 体分子の蛍光を観察することができるので、蛍光検出手段の位置合わせが容易になる。また、微小開口の間隔は蛍光検出手段の分解能と同じか又は蛍光検出手段の分解能よりも大きいので、それぞれの微小開口によって励起された個々の蛍光性生体分子の蛍光を分離して、1 分子レベルで生体分子間相互作用を検出することができる。

- 20 本発明の請求項 3 6 記載の生体分子間相互作用解析方法は、励起光の波長よりも小さい微小開口から前記励起光によるエバネッセント場を発生させ、このエバネッセント場の領域をブラウン運動により通過する蛍光性生体分子を励起させ、その蛍光性生体分子の蛍光を検出することを特徴とする。

この構成によれば、励起光の波長より小さい領域で励起光を蛍光性生体分子に  
25 照射することができ、生体分子間相互作用を 1 分子レベルで検出、定量することができる。

本発明の請求項 3 7 記載の生体分子間相互作用解析方法は、励起光の波長よりも小さい微小開口から前記励起光によるエバネッセント場を発生させ、この微小開口に付着させた第一の蛍光性生体分子と、前記エバネッセント場の領域にあつ

て前記第一の蛍光性生体分子と相互作用する第二の蛍光性生体分子とを励起させ、これら第一の蛍光生体分子と第二の蛍光性生体分子の蛍光をそれぞれ検出することを特徴とする。

この構成によれば、励起光の波長より小さい領域で励起光を蛍光性生体分子に  
5 照射することができ、生体分子間相互作用を1分子レベルで検出、定量することができる。

#### 図面の簡単な説明

図1は、本発明の第一実施例を示すマイクロシステムの上面図とそのA-A線  
10 における断面図である。

図2は、同上図1のB-B線における液体流路の断面図である。

図3は、同上図1のB-B線付近における液体流路の断面図である。

図4は、本発明の第二実施例を示すマイクロシステムの図1のB-B線における液体流路の断面図である。

15 図5は、本発明の第三実施例を示すマイクロシステムの上面図である。

図6は、同上図5のC-C線における液体流路の断面図である。

図7は、同上変形例を示す図5のC-C線における液体流路の断面図である。

図8は、本発明の第四実施例を示すマイクロシステムの上面図である。

図9は、同上変形例を示すマイクロシステムの上面図である。

20 図10は、同上別の変形例を示すマイクロシステムの上面図である。

図11は、本発明の第五実施例を示すマイクロシステムの上面図である。

図12は、本発明の第六実施例を示すマイクロシステムの上面図である。

図13は、本発明の第七実施例を示すマトリックス型可変液体流路の平面図である。

25 図14は、同上図13のE-E線におけるマトリックス型可変液体流路の断面図である。

図15は、同上マトリックス型可変液体流路が基礎台に収まっている状態を示す平面図である。

図16は、同上電圧をかけることにより刺激を付与する刺激付与手段の概念図

である。

図 1 7 は、同上マトリックス型可変液体流路を試料物質が流れている状態を示す概念図である。

5 図 1 8 は、本発明の第八実施例を示すマトリックス型可変液体流路システムの概念図である。

図 1 9 は、同上応用例 1 において、試料物質移動の状態を示すマトリックス型可変液体流路の概念図である。

図 2 0 は、同上応用例 2 において、試料物質移動の状態を示すマトリックス型可変液体流路の概念図である。

10 図 2 1 は、同上応用例 2 において、試料物質移動後の状態を示すマトリックス型可変液体流路の概念図である。

図 2 2 は、同上応用例 3 において、マトリックス型可変液体流路をサンプルが流れている状態を示す概念図である。

15 図 2 3 は、同上応用例 3 において、壁でサンプルを囲んでいる状態を示す平面図である。

図 2 4 は、同上応用例 3 において、液体流路を変形した状態を示す平面図である。

図 2 5 は、同上応用例 4 において、マトリックス型可変液体流路をサンプルが流れている状態を示す概念図である。

20 図 2 6 は、同上応用例 4 において、電気泳動をさせている状態を示す図である。

図 2 7 は、本発明の第九実施例を示す微小開口膜の正面図である。

図 2 8 は、同上微小開口によるエパネッセント場の発生を示す模式図である。

25 図 2 9 は、本発明の第十実施例を示す生体分子間相互作用解析装置の微小開口を用いた F C S の測定原理の模式図である。

図 3 0 は、同上微小開口を用いた F C S 装置の模式図である。

図 3 1 は、本発明の第十一実施例を示す生体分子間相互作用解析装置の微小開口を用いた F C C S の測定原理の模式図である。

図 3 2 は、同上微小開口を用いた F C C S 装置の模式図である。

図 3 3 は、本発明の第十二実施例を示す生体分子間相互作用解析装置の微小開口を用いた 1 分子蛍光イメージング法の測定原理の模式図である。

図 3 4 は、同上微小開口を用いた 1 分子蛍光イメージング装置の模式図である。

- 5 図 3 5 は、従来の全反射によるエバネッセント場を用いた生体分子観察法を示す模式図である。

図 3 6 は、従来の F C S の原理を示す模式図である。

発明を実施するための最良の形態

- 10 以下、本発明について詳細に説明する。はじめに、図 1，図 2 に基づき、本発明の第一実施例のマイクロシステムについて説明する。1 はガラスやシリコンなどからなる基板である。基板 1 の大きさは、一辺が 1 0 m m 程度であって、この基板 1 上には、液体流路 2 が形成されている。この液体流路 2 は、断面が幅 3 0  $\mu$  m  $\times$  深さ 5  $\mu$  m 程度であって、液体流路 2 a と、この液体流路 2 a から分岐点 3 で分岐した 2 本の液体流路 2 b，2 c とから構成されている。また、液体流路 2 a の分岐点 3 の反対側には貫通路 4 a、液体流路 2 b の分岐点 3 の反対側には貫通路 4 b、液体流路 2 c の分岐点 3 の反対側には貫通路 4 c が、それぞれ基板 1 の上下を貫通して形成されている。そして、ガラスなどで形成されたカバー部材 1 a が、液体流路 2 a，2 b，2 c と貫通路 4 a，4 b，4 c を覆って、基板 20 1 の上面と密着して設けられている。

- 分岐点 3 と近接した部位における液体流路 2 b，2 c の底面と側面には、それぞれ刺激付与手段としての熱源たるマイクロヒーター 5 b，5 c が設けられている。このマイクロヒーター 5 b，5 c には、それぞれ正電極 6 b，6 c と負電極 7 が電気的に接続しており、負電極 7 は接地されている。また、正電極 6 b，6 c はそれぞれスイッチ 8 b，8 c の一端側が接続し、スイッチ 8 b，8 c の他端側には可変抵抗 9 を介して直流電源 10 が接続している。なお、スイッチ 8 b，8 c と可変抵抗 9 は、図示しない制御手段により動作が制御されるように構成されている。

また、図 3 に示すように、分岐点 3 と近接した部位における液体流路 2 b，2

cの底面と側面には、前記マイクロヒーター5b、5cと隣接して、刺激検知手段としての熱センサーたる熱電対11b、11cがそれぞれ設けられている。そして、これら熱電対11b、11cは制御手段に電氣的に接続し、制御手段はこれら熱電対11b、11cからの信号に基づき可変抵抗9を制御してマイクロヒーター5b、5cへ与える電圧を制御するように構成されている。

つぎに作用について説明する。まず、液体流路2に流す液体を貫通路4aから図示しないシリンジポンプなどを用いて導入する。なお、この液体には、37℃でゾルーゲル転移し、37℃未満ではゾル状、37℃を超えるとゲル状となる熱可逆性ハイドロゲル材料を添加しておく。この熱可逆性ハイドロゲル材料としては、温度変化に対応して完全な可逆性を有するものが好ましく、例えば、特開平5-262882号公報に開示されているものなどを用いることができる。ゾルーゲル転移の温度は、低すぎると室温でゲル化してしまうので好ましくなく、高すぎるとゲル化の際に、例えば液体に含まれるタンパク質などの試料が熱変性してしまうので好ましくない。なお、使用する熱可逆性ハイドロゲル材料を選択することにより、適宜、好ましいゾルーゲル転移の温度に変更してもよい。また、使用する熱可逆性ハイドロゲル材料は、液体流路2に流す液体やこの液体に含まれる試料などと反応したり影響を与えたりしないように、種類や濃度などを選択、調整する。

そして、制御手段により、例えばスイッチ8bをオンにすると、液体流路2bに設けられたマイクロヒーター5bに電圧が印加され、マイクロヒーター5b上の液体が加熱される。この加熱によって、液体に含まれる熱可逆性ハイドロゲル材料が急速にゲル化し、液体流路2bの分岐点3と近接した部位がこのゲル化した熱可逆性ハイドロゲル材料によって閉塞される。したがって、液体は液体流路2c側へ流れる。このとき、制御手段は、マイクロヒーター5bと隣接して設けられた熱電対11bからの信号に基づいて可変抵抗9を制御し、適正な量の刺激としての熱を液体に付与する。したがって、液体に付与される熱が少なすぎて熱可逆性ハイドロゲル材料がゲル化しなかったり、逆に熱が多すぎて液体に含まれる試料が変性したりする虞はない。なお、液体に付与する熱が多すぎると、マイクロヒーター6bへの電圧の印加を停止してから熱可逆性ハイドロゲル材料がゾル



化するまでに時間がかかる虞があり、好ましくない。

スイッチ 8 b をオフし、スイッチ 8 c をオンにすると、マイクロヒーター 5 b への電圧の印加が停止してマイクロヒーター 5 b 上の液体が冷えてゾル化し、液体流路 2 c に設けられたマイクロヒーター 5 c に電圧が印加される。そして、マイクロヒーター 5 c 上の液体が加熱されることによって、液体流路 2 c の分岐点 3 と近接した部位がゲル化した熱可逆性ハイドロゲル材料によって閉塞される。したがって、液体は液体流路 2 b 側へ流れる。このとき、制御手段は、マイクロヒーター 5 c と隣接して設けられた熱電対 11 c からの信号に基づいて可変抵抗 9 を制御し、適正な刺激としての熱の量を液体に付与する。

10      このような熱可逆性ハイドロゲル材料のゾルゲル転移は、液体流路 2 が微細であるほど急速に行われ、本実施例のような断面が幅  $30\ \mu\text{m}$  × 深さ  $5\ \mu\text{m}$  程度の場合は、ミリ秒単位でゾルゲル転移を切り替えることも可能である。したがって、液体流路 2 b, 2 c の切り替えを極めて迅速に行うことができ、これを利用すれば、必要な液体中の試料を確実に分取することが可能となる。

15      以上のように、本実施例によれば、基板 1 に形成された液体流路 2 b, 2 c を流れる液体に刺激を付与する刺激付与手段たるマイクロヒーター 5 b, 5 c を備え、このマイクロヒーター 5 b, 5 c からの刺激によって液体の流れを制御するように構成したマイクロシステムにおいて、前記マイクロヒーター 5 b, 5 c が液体に付与する刺激の量を電氣的に制御する制御手段を備えたものであり、制御手段によってマイクロヒーター 5 b, 5 c が液体に付与する刺激の量を電氣的に制御することにより、刺激の量を適正值にすることが可能になる。

25      また、刺激の量を検知する刺激検知手段たる熱電対 11 b, 11 c を備え、この熱電対 11 b, 11 c からの信号に基づき制御手段がマイクロヒーター 5 b, 5 c を制御するように構成したものであり、刺激の量を適正值にすることができる。また、マイクロヒーター 5 b, 5 c を用いることによって、確実に液体に刺激を与えることができる。

また、熱電対 11 b, 11 c を用いることによって、確実にマイクロヒーター 5 b, 5 c が液体に与えた刺激の量を検知することができ、熱センサーを簡単に構成することができる。

つぎに、本発明の第二実施例について説明する。なお、上記第一実施例と同じ部分には同じ符号を付し、その詳細な説明を省略する。本実施例では、図4に示すように、刺激検知手段として、第一実施例の熱電対11b, 11cの代わりに、熱感応性半導体12b, 12cを設けたものである。この熱感応性半導体12b, 12cは、マイクロヒーター5b, 5dの上方のカバー部材1a中に設けられている。また、この熱感応性半導体12b, 12cの代わりに、赤外線感応性センサーを設けてもよい。

以上のように、本実施例によれば、熱感応性半導体12b, 12c又は赤外線感応性センサーを用いたので、確実に刺激の量を検知することができる。

10 つぎに、本発明の第三実施例について説明する。図5, 図6において、21はガラスなどの透明な材料からなる基板である。基板21の大きさは、一辺が10mm程度であって、この基板21上には、液体流路22が形成されている。この液体流路22は、断面が幅30 $\mu$ m $\times$ 深さ5 $\mu$ m程度であって、液体流路22aと、この液体流路22aから分岐点23で分岐した2本の液体流路22b, 22cとから構成されている。また、液体流路22aの分岐点23の反対側には貫通路24a、液体流路22bの分岐点23の反対側には貫通路24b、液体流路22cの分岐点23の反対側には貫通路24cが、それぞれ基板21の上下を貫通して形成されている。そして、ガラスなどの透明な部材で形成されたカバー部材21aが、液体流路22a, 22b, 22cと貫通路24a, 24b, 24cを覆って、基板21の上面と密着して設けられている。

20 分岐点23と近接した部位における液体流路22b, 22cに近接して、それぞれ刺激付与手段としての光源たる発光素子として半導体レーザー25b, 25cが設けられている。この半導体レーザー25b, 25cは、図6に示すように、基板21に埋め込まれており、半導体レーザー25b, 25cのそれぞれの発光部26b, 26cからの赤外線レーザー光が、それぞれ、分岐点23と近接した部位における液体流路22b, 22cに照射されるように構成されている。なお、この半導体レーザー25b, 25cは、図示しない制御手段により動作が制御されるように構成されている。なお、半導体レーザー25b, 25cは、図7に示すように、基板21とカバー部材21aとに跨るように埋め込んで設置してもよい。

また、液体流路22b, 22cの半導体レーザー25b, 25cにより赤外線レーザー

光が照射される部位には、図示しない赤外線感応性センサーがそれぞれ設けられている。そして、この赤外線感応性センサーは制御手段に電氣的に接続し、制御手段はこの赤外線感応性センサーからの信号に基づき半導体レーザー25 b, 25 cの動作を制御するように構成されている。

- 5 つぎに作用について説明する。まず、液体流路22に流す液体を貫通路24 aから図示しないシリンジポンプなどを用いて導入する。なお、この液体には、37℃でゾルゲル転移し、37℃未満ではゾル状、37℃を超えるとゲル状となる熱可逆性ハイドロゲル材料を添加しておく。この熱可逆性ハイドロゲル材料については、第一実施例と同様であるので、詳細な説明は省略する。
- 10 そして、制御手段により、例えば半導体レーザー25 bをオンにすると、半導体レーザー25 bから液体流路22 bの分岐点23と近接した部位にある液体に赤外線レーザー光が照射され、その部位の液体が加熱される。この加熱によって、液体に含まれる熱可逆性ハイドロゲル材料が急速にゲル化し、液体流路22 bの分岐点23と近接した部位がこのゲル化した熱可逆性ハイドロゲル材料によって閉塞され
- 15 る。したがって、液体は液体流路22 c側へ流れる。このとき、制御手段は、赤外線感応性センサーからの信号に基づいて半導体レーザー25 bを制御し、適正な量の刺激としての赤外線レーザー光を液体に付与する。したがって、液体に付与される赤外線レーザー光が弱すぎて熱可逆性ハイドロゲル材料がゲル化しなかったり、逆に赤外線レーザー光が強すぎて液体に含まれる試料が変性したりする虞は
- 20 ない。

- 半導体レーザー25 bをオフし、半導体レーザー25 cをオンにすると、それまで赤外線レーザー光が照射されていた液体流路22 bの分岐点23と近接した部位の液体が冷えてゾル化し、半導体レーザー25 cから液体流路22 cの分岐点23と近接した部位にある液体に赤外線レーザー光が照射され、その部位の液体が加熱され
- 25 る。この加熱によって、液体に含まれる熱可逆性ハイドロゲル材料が急速にゲル化し、液体流路22 cの分岐点23と近接した部位がこのゲル化した熱可逆性ハイドロゲル材料によって閉塞される。したがって、液体は液体流路22 b側へ流れる。このとき、制御手段は、赤外線感応性センサーからの信号に基づいて半導体レーザー25 cを制御し、適正な量の刺激としての赤外線レーザー光を液体に付与する

。以上のように、本実施例によれば、基板21に形成された液体流路22b, 22cを流れる液体に刺激を付与する刺激付与手段たる半導体レーザー25b, 25cを備え、この半導体レーザー25b, 25cからの刺激によって液体の流れを制御するように構成したマイクロシステムにおいて、半導体レーザー25b, 25cが液体に付与する刺激の量を電氣的に制御する制御手段を備えたものであり、制御手段によって半導体レーザー25b, 25cが液体に付与する刺激の量を電氣的に制御することにより、刺激の量を適正值にすることが可能になる。

また、刺激の量を検知する刺激検知手段たる赤外線感応性センサーを備え、この赤外線感応性センサーからの信号に基づき制御手段が半導体レーザー25b, 25cを制御するように構成したものであり、刺激の量を適正值にすることができる。また、発光素子たる半導体レーザー25b, 25cを用いることによって、確実に液体に刺激を与えることができる。

また、赤外線感応性センサーを用いることによって、確実に半導体レーザー25b, 25cが液体に与えた刺激の量を検知することができる。

また、半導体レーザー25b, 25cは基板21に設置されたので、光源を簡単に構成することができる。

また、半導体レーザー25b, 25cは基板21に埋め込まれたので、半導体レーザー25b, 25cを液体流路22b, 22cの近傍に配することができ、確実に液体に刺激を与えることができる。

つぎに、本発明の第四実施例について説明する。なお、上記第三実施例と同じ部分には同じ符号を付し、その詳細な説明を省略する。本実施例では、図8に示すように、基板21を載置台31に載置し、半導体レーザー25b, 25cを基板21の外の載置台31上に配置している。この場合、図9に示すように、半導体レーザー25b, 25cから照射される赤外線レーザー光を液体流路22b, 22cへ導く光導入路27b, 27cを設けてもよい。この光導入路27b, 27cは、液体流路22b, 22cが形成された基板21の面と水平に形成されており、基板21に空洞を形成してその側面に赤外線レーザー光を反射する金属箔を設けたものである。または、その空洞に基板21を形成する材料よりも屈折率の低い材料を充填し、空洞の側面で赤外線

レーザー光が全反射するように構成してもよい。また逆に、その空洞に基板21を形成する材料よりも屈折率の高い材料を充填し、空洞の側面で赤外線レーザー光が全反射するように構成してもよい。

5 以上のように、本実施例によれば、半導体レーザー25b, 25cは基板21の外に配置されたものであり、基板21を使い捨てにしても、半導体レーザー25b, 25cは繰り返し使用することができる。

また、半導体レーザー25b, 25cからの光を導入する光導入路27b, 27cを液体流路22b, 22cが形成された基板21の面と水平に形成したものであり、半導体レーザー25b, 25cからの光を効率良く液体流路22b, 22cへ導入することができ  
10 きる。

さらに、半導体レーザー25b, 25cは複数個設置されたので、液体通路22b, 22cの異なる複数の箇所において、刺激を付与することができる。

なお、図10に示すように、図示しない制御手段によってミラー28b, 28cを制御することにより、1つの半導体レーザー25からの赤外線レーザー光を、2つの液体流路22b, 22cのいずれかに選択的に照射するように構成してもよい。  
15

つぎに、本発明の第五実施例について説明する。上記第三実施例または第四実施例と同じ部分には同じ符号を付し、その詳細な説明を省略する。本実施例では、図11に示すように、液体流路22aの液体にエネルギーとしての励起光を付与するエネルギー付与手段たる半導体レーザー41と、この半導体レーザー41からの励起光によって励起される物質からの蛍光を検知するための変化検知手段たる蛍光検知素子42とが基板21の外の載置台31上に設けられている。また、蛍光検知素子42は、必要に応じて半導体レーザー41からの励起光を検出する励起光検知素子42aに切り替えられるように構成されている。この励起光検知素子42aは、後述するように、載置台31に基板21の位置を決める位置決め手段となる。なお、変化  
20 検知手段を蛍光検知素子42の代わりに、受光素子で構成してもよい。

また、基板21には、半導体レーザー41から照射される励起光を液体流路22aへ導くエネルギー導入路43が形成されている。このエネルギー導入路43は、液体流路22aが形成された基板21の面と水平に形成されており、基板21に空洞を形成してその側面に励起光を反射する金属箔を設けたものである。または、その空洞に

基板21を形成する材料よりも屈折率の低い材料を充填し、空洞の側面で励起光が全反射するように構成してもよい。また逆に、その空洞に基板21を形成する材料よりも屈折率の高い材料を充填し、空洞の側面で励起光が全反射するように構成してもよい。

- 5      さらに、基板21には、半導体レーザー41からの励起光によって励起される液体流路22 a の液体中の物質からの蛍光を蛍光検知素子42へ導く蛍光導出路44が形成されている。この蛍光導出路44は、液体流路22 a が形成された基板21の面と水平に形成されており、前記エネルギー導入路43と同様、基板21に空洞を形成してその側面に励起光を反射する金属箔を設けたものである。または、その空洞に基板
- 10   21を形成する材料よりも屈折率の低い材料を充填し、空洞の側面で励起光が全反射するように構成してもよい。また逆に、その空洞に基板21を形成する材料よりも屈折率の高い材料を充填し、空洞の側面で励起光が全反射するように構成してもよい。また、エネルギー導入路43と蛍光導出路44は一直線上に形成されている。

- 15      そして、半導体レーザー41は図示しない制御手段によって制御され、蛍光検知素子42からの信号に基づき、制御手段が半導体レーザー25 b, 25 c を制御するように構成されている。

- つぎに作用について説明する。まず、載置台31に基板21を載置する。このとき、半導体レーザー41からの励起光がエネルギー導入路43と蛍光導出路44を経由して
- 20   励起光検出素子42 a で最も強く検出される位置に基板21を固定する。このように位置決め手段として半導体レーザー41と励起光検出素子42 a を用いることによって、基板21を取り替えた場合においても、載置台31上の定位置に正確に基板21を載置することができる。

- そして、液体流路22に流す液体を貫通路24 a から図示しないシリンジポンプなどを用いて導入する。なお、この液体には、37℃でゾルーゲル転移し、37℃未満ではゾル状、37℃を超えるとゲル状となる熱可逆性ハイドロゲル材料を添加しておく。この熱可逆性ハイドロゲル材料については、第一実施例と同様であるので、詳細な説明は省略する。

以下、この液体中に存在する試料を分取する場合を例にとって、説明する。こ

の試料は、例えばたんぱく質分子であって、必要に応じて蛍光物質で標識化しておいてもよい。また、予め、液体流路22aに液体が2mm/秒程度で流れるように、シリンジポンプなどからの液体の導入速度を調整する。この流体速度は、100mm/秒以下が適当であった。ただし、流速は検出器の構成、流路の構造によって決まる値であり、本発明の本質ではない。そして、液体流路22aを流れる液体に半導体レーザー41からエネルギー導入路43を経由して励起光を照射し、蛍光導出路44を経由して蛍光検知素子42によって目的の試料からの蛍光を検出する。この蛍光検知素子42による蛍光の検知は、例えば10ミリ秒毎に行い、その結果を制御手段へ出力する。ただし、蛍光の検出周期は検出器の構成によって決まる値であり、本発明の本質ではない。

目的の試料からの蛍光が検出されない場合は、制御手段は半導体レーザー25bをオンにし、半導体レーザー25bから液体流路22bの分岐点23と近接した部位にある液体に赤外線船レーザー光が照射され、その部位の液体が加熱される。この加熱によって、液体に含まれる熱可逆性ハイドロゲル材料が急速にゲル化し、液体流路22bの分岐点23と近接した部位がこのゲル化した熱可逆性ハイドロゲル材料によって閉塞される。したがって、液体は液体流路22c側へ流れ、この液体は貫通路24cから廃棄される。このとき、制御手段は、赤外線感応性センサーからの信号に基づいて半導体レーザー25bを制御し、適正な量の刺激としての赤外線レーザー光を液体に付与する。

目的の試料からの蛍光が検出されると、制御手段は半導体レーザー25bをオフし、半導体レーザー25cをオンにする。すると、それまで赤外線レーザー光が照射されていた液体流路22bの分岐点23と近接した部位の液体が冷えて急速にゾル化し、半導体レーザー25cから液体流路22cの分岐点23と近接した部位にある液体に赤外線船レーザー光が照射され、その部位の液体が加熱される。この加熱によって、液体に含まれる熱可逆性ハイドロゲル材料が急速にゲル化し、液体流路22cの分岐点23と近接した部位がこのゲル化した熱可逆性ハイドロゲル材料によって閉塞される。したがって、液体は液体流路22b側へ流れ、目的の試料を含む液体が貫通路24bから回収される。このとき、制御手段は、赤外線感応性センサーからの信号に基づいて半導体レーザー25cを制御し、適正な量の刺激としての

赤外線レーザー光を液体に付与する。

このように、液体通路22aを流れる液体に半導体レーザー41から励起光を照射し、目的の試料からの蛍光を10ミリ秒毎という非常に短い周期で蛍光検知素子42で検出し、さらに、この検出結果に基づいて制御手段により半導体レーザー25b, 25cを制御して液体流路22b又は液体流路22cへ液体の流れを切り替えること  
5 によって、目的の試料を1分子単位で分取することができる。

以上のように、本実施例によれば、液体にエネルギーたる励起光を付与するエネルギー付与手段たる半導体レーザー41と、この半導体レーザー41からの励起光によって変化たる蛍光を生じる物質の蛍光を検知する変化検知手段たる蛍光検知  
10 素子42を備え、この蛍光検知素子42からの信号に基づき制御手段が刺激付与手段たる半導体レーザー25b, 25cを制御するように構成したものであり、半導体レーザー41からの励起光によって蛍光を生じる物質の蛍光に基づき液体の流れを制御することによって、その物質が含まれる液体のみを容易に取り分けることができる。

15 また、半導体レーザー41からの励起光を導入するエネルギー導入路43を基板21の面と水平に形成したものであり、半導体レーザー41からの励起光を効率良く液体流路22aへ導入することができる。

また、蛍光検知素子44又は受光素子を用いることによって、確実に半導体レーザー41からの励起光によって蛍光を生じる物質の蛍光を検知することができる。

20 また、蛍光検知素子44又は受光素子は基板21の面と水平に配置されたものであり、半導体レーザー41からの励起光によって蛍光を生じる物質の蛍光を液体流路22aの側面から検出することができる。

さらに、基板21を載置する載置台31を備え、この載置台31に基板21の位置を決める位置決め手段たる半導体レーザー41と励起光検出素子42aを備えたものであり、半導体レーザー41と励起光検出素子42aによって載置台31の正しい位置に簡  
25 単に基板21を載置することができ、特に、基板21を使い捨てにした場合において正確に基板21を載置する際の位置あわせの手間を省くことができる。

つぎに、本発明の第六実施例について説明する。上記第五実施例と同じ部分には同じ符号を付し、その詳細な説明を省略する。本実施例では、図12に示すよ



うに、半導体レーザー41は基板21の液体流路22aの近傍に埋め込まれており、蛍光検知素子42は、液体流路22aの半導体レーザー41の励起光が照射される部位の上方に配置されている。なお、蛍光検知素子42の代わりに受光素子を液体流路22aの半導体レーザー41の励起光が照射される部位の上方に配置してもよい。

- 5      また、載置台31には、基板21を定位位置に固定するための位置決め手段としてのガイド部材51が3箇所設けられている。このガイド部材51は基板21の3つの隅を固定するものであって、載置台31と一体に設けられている。なお、ガイド部材51を設ける代わりに、基板21と載置台31にそれぞれマーキング52、53を施しておき、2つのマーキング52、53を合わせることによって載置台31に基板21を位置決め
- 10    するように構成してもよい。また、ガイド部材51とマーキング52、53を併用して、基板21の位置のみならず向きをも規定するように構成してもよい。さらには、図示しないが、基板21の底面と載置台31の上面に相互に対応した形状の凹部と凸部をそれぞれ設け、この凹部に凸部を嵌合することによって載置台31に基板21を位置決めするように構成してもよい。

- 15    以上のように、本実施例によれば、蛍光検知素子42又は受光素子は液体流路22aの上方に配置されたものであり、半導体レーザー41からの励起光によって蛍光を生じる物質の蛍光を液体流路22aの上方から検出することができる。

- また、基板21を載置する載置台31を備え、この載置台31に基板21の位置を決める位置決め手段たるガイド部材51を備えたものであり、ガイド部材51によって載置台31の正しい位置に簡単に基板21を載置することができ、特に、基板21を使い捨てにした場合において正確に基板21を載置する際の位置あわせの手間を省くことができる。
- 20

- なお、本発明は上記の実施例に限定されるものでなく、本発明の要旨の範囲内において種々の変形実施が可能である。例えば、基板に形成される液体流路は3つ以上に分岐したり、又は合流したりしてもよく、必要に応じて刺激付与手段、刺激検知手段、エネルギー付与手段、変化検知手段などの配置や数量などを適宜変更してもよい。また、刺激付与手段が付与する刺激を電圧とし、電圧の高低に応じてゾルーゲル転移する電圧可逆性ハイドロゲル材料を用いてもよい。または、複数の基板を組み合わせてマイクロシステムを構成してもよい。
- 25

つぎに、図13および14に基づき、本発明の第七実施例のマトリックス型可変液体流路について説明する。

マトリックス型可変液体流路は、縦 $200\mu\text{m}$ 、横 $200\mu\text{m}$ 、厚さ $5\mu\text{m}$ の大きさのガラス基板102上に、刺激感応部材として縦 $10\mu\text{m}$ 、横 $10\mu\text{m}$ 、厚さ $6\text{nm}$ の金属片103が、 $10\mu\text{m}$ の間隔を空けて縦横の二次元マトリックス状、すなわち、二次元の行列で配置さるよう

に構成されている。この刺激感応部材103の形状としては、平面正方形に限られず、長方形や多角形、さらには円形でも良い。

この刺激感応部材である金属片103は、チタン、クロムなどの金属を蒸着、スパッタリング、化学気層成長(CVD)、めっき、プラズマ重合、又はスクリーン印刷により、マスキング法などの通常の方法で形成することができる。

ガラス基板102の四辺には、幅 $20\mu\text{m}$ 、深さ $5\mu\text{m}$ の外部接続流路104が複数設けられており、そのうちの二辺には、流入路104aと流出路104bが対向するようにそれぞれ4個並べられている。残りの二辺には、流入路104c、104dが対向するようにそれぞれ4個並べられている。

そして、ガラス基板102(マトリックス型可変液体流路)は、図15に示すように、基礎台101の中央部分に収まっている。この基礎台101の大きさは、一辺が $20\text{mm}$ 程度であって、ガラスやシリコンなどからなっている。

なお、基礎台101とガラス基板102は必ずしも分けて構成されている必要はなく、一体的に構成されていても良い。例えば、後述するように、光を用いて刺激感応部材103を刺激する場合は、基礎台101側から刺激感応部材103に光を照射する場合があります。基礎台101とガラス基板102をガラスなどで一体として構成しても良い。一方、スイッチ制御装置により刺激感応部材103を刺激する場合は、基礎台101とガラス基板102との間に必要なダイオードなどの素子を埋め込むのに便利であることから、基礎台101とガラス基板102を分けて構成するのが良い。

また、この基礎台101には、ガラス基板102と接続する外部接続流路104が設けられ、ガラス基板102と反対の側には、基礎台101を貫通して形成されている貫通路105が設けられており、ここから、図示しないシリンダポンプなどを用いて溶液を外部接続流路104に流入させ、またガラス基板102上を流れた溶液を外部接続

流路104を通して貫通路105へ流出させることができるようになっている。

そして、この基礎台101上には、ガラス基板102および外部接続流路104を全面的に覆うように厚さ100  $\mu\text{m}$ のカバーガラス108が設けられている。これにより、ガラス基板上の溶液は、ガラス基板102とカバーガラス108とで挟まれた空間を流れることになる。このガラス基板102とカバーガラス108の間隔（高さ）は、  
5 5～20  $\mu\text{m}$ が好ましい。

なお、図15では、貫通路105は基礎台101に設けられているが、特にこれに限定されるものではなく、試料の検出に支障をきたさないような位置であれば良く、例えば、カバーガラス108や基礎台101のサイドに設けても良い。

10 刺激感応部材としての金属片103に刺激を付与する方法としては、スイッチ制御装置により金属片103に電圧をかけ、これを加熱する方法、スキャナーミラーや音響光学偏向器を用いてレーザー光を金属片103に照射する方法、デジタルミラーデバイスを用いてレーザー光やランプの光を金属片103に照射する方法などを用いることができる。

15 図16は、スイッチ制御装置により金属片103加熱する方法の概念を示した図である。この方法では、ガラス基板102に抵抗体（刺激感応部材）としての金属片103とダイオード111のマトリックスからなる回路を組み込み、スイッチング素子112により金属片103を発熱させるものである。

図16では、例として、i行の回路を模式的に示しているが、同様な回路が1  
20 行からm行（mは任意の整数）と1列からn列（nは任意の整数）にも設けられており、行と列が交差する箇所には金属片103が設けられている。そして、例えば、i行とj列に入力する（例えば電圧をLowにする。）と、i行j列の金属片103に電圧がかかり、電流が流れ発熱するものである。そして、この入力はコンピュータを用いて制御することができる。

25 また、光を用いて金属片103を加熱する方法として、例えば以下の方法がある。1つは、レーザーをスキャナーミラーや音響光学偏向器を用いて金属片103に照射する方法である。例えば、Nd:YAGレーザー（発振波長1064 nm、800 mW）などの赤外線レーザーを用いて、ビームが流路のパターンに沿って移動するように、コンピュータに搭載したDA変換ボードからの出力をスキャナ

ーミラーのサーボドライバ、あるいは、例えばNEOS Technologies社製の音響光学偏向器N45000に入力することにより、金属片103を加熱することができる。この場合発振波長が約300～約1600nmのレーザーを使用することが可能であるが、特に発振波長が約700～約1600nmの半  
5 導体レーザー（赤外線レーザー）が、生体試料の検出の妨げにならず好ましい。

デジタルミラーデバイスを用いて金属片103に照射する方法は、例えば、コンピュータにデュアルモニターを搭載し、1番目のモニターは、画像解析する像の出力と操作に使用し、2番目のモニターに液体流路のパターンを出力するようなプログラムによりパターン出力をする。そして、2番目のモニター出力をデジ  
10 タルミラーデバイスに液体流路のパターンとして出力する。そして、デジタルミラーデバイスをマトリックス型可変液体流路と光学的に共役な位置に置き、これにレーザーやランプ（水銀ランプやキセノンランプ）の光を照射することにより、金属片103を加熱することができる。

つぎに、液体流路を形成する壁やバルブの構造体について説明する。

15 外部接続流路104からガラス基板102上に流れ出る溶液には、例えば、熱感受性物質を含ませ、この熱感受性物質に刺激である熱を加えることにより可逆的にゾルーゲル化させることができる。

熱感受性物質としては、37℃でゾルーゲル転移し、37℃未満ではゾル状、37℃を超えるとゲル状となる熱可逆性ハイドロゲルを用いることができ、この  
20 熱可逆性ハイドロゲルとしては、温度変化に対応して完全な可逆性を有するものが好ましく、例えば、特開平5-262882号公報に開示されているものなどを用いることができる。好ましいものとしては、例えば、メチルセルロースやメビオールゲル（ゾルーゲル変換温度が約36℃）がある。

ゾルーゲル転移の温度は、低すぎると室温でゲル化してしまうので好ましくな  
25 く、高すぎるとゲル化の際に、例えば溶液に含まれるタンパク質などの試料物質が熱変性してしまうので好ましくない。なお、使用する熱可逆性ハイドロゲル材料を選択することにより、適宜、好ましいゾルーゲル転移の温度に変更しても良い。

また、使用する熱可逆性ハイドロゲルは、溶液やこの溶液に含まれる試料物質

と反応したり影響を与えたりしないように、種類や濃度などを選択、調整する。

そして、ガラス基板102上に流出した溶液に、上述したスイッチ制御装置により金属片103を加熱する方法、赤外線レーザーをスキャナーミラーや音響光学偏向器を用いて金属片103に照射する方法、光をデジタルミラーデバイスを用いて  
5 金属片103に照射する方法などにより、ガラス基板102上の金属片103を加熱することにより、溶液中に含まれている熱感受性物質をゾルーゲル転移によりゲル化し、このゲルが液体流路を形成する壁やバルブの構造体となる。

なお、試料物質をガラス基板102上に流出させる前に液体流路の形成しておきたい場合は、あらかじめ、ガラス基板102上を熱感受性物質を含む溶液で満たし  
10 ておき、この状態で任意の位置の金属片103を加熱することにより液体流路を形成させておくことができる。

図17は、図13に示すガラス基板に刺激を付与して任意の位置をゲル化させて壁やバルブの構造体を作製した様子を示したもので、図13と同じ部分については同じ符号を用いたのでその説明を省略する。

15 図17では、流入路104aのうち、1番目(In1)、2番目(In2)および4番目(In4)の流入路から、熱感受性物質を含む溶液をガラス基板102上に流出させ、上述した電圧や光などによる刺激を付与する手段により任意の金属片103を加熱することにより、金属片103上に流れている熱感受性物質をゲル化させ、ガラス基板102上に壁106を形成した状態を示している。

20 そして、107は溶液中に含まれる試料物質を示しており、先端の矢印は、この試料物質107が流れていく方向を示している。

なお、図17では、流出口104bのうち、1番目(Out1)および3番目(Out3)の流出口から、外部接続流路104へ溶液とともに試料物質107が流出するようになっている。

25 そして、一定量の試料物質107が1番目(Out1)および3番目(Out3)の流出口から流出した場合や、他の試料物質がガラス基板102上に流出してきた場合など、必要に応じて、上述した刺激を付与する手段により、ゲル化して壁106を構成している部分をゾル化し、新たな部分の金属片103に刺激を与えてゲル化させて壁やバルブの構造体106を形成することにより、液体流路を変更するこ

とができる。

さらに、目的とする試料物質107がガラス基板102上に流出してきた場合、この試料物質107を囲むような位置の金属片103に刺激を与えてゲル化させれば、試料物質107をガラス基板102上に滞在させることができるので、これにより試料の分

5 析をおこなうこともできる。

以上のように、本実施例によれば、ガラス基板102上に複数の刺激感応部材103を二次元マトリックス状に配置したことにより、刺激感応部材103を刺激することで任意の位置で、可逆的にゾルーゲル転移による壁やバルブの構造体106を構成することができるので、液体流路の作製が容易である。また、流路形状を自由  
10 に変更できるので、異なった流路形状を有する液体流路の準備が不要となる。

また、刺激感応部材103を刺激するのでゾルーゲル転移を起こす物質のゲル化速度が速くなり、刺激感応部材103に間隔があることにより任意の位置でのゲル化が容易となる。そして、ゲル化領域が接続することで壁やバルブの構造体106を形成することができる。

15 また、刺激感応部材103は蒸着、スパッタリング、化学気層成長（CVD）、めっき、プラズマ重合、又はスクリーン印刷により形成されるので、形成が容易である。

さらに、電圧をかけることまたは光を照射することにより刺激感応部材103に刺激を付与するように構成されているので、刺激感応部材103の温度を調整でき  
20 、ゾルーゲル転移を容易に起こさせることができる。

つぎに、本発明の第八実施例について説明する。

図18は、本発明のマトリックス型可変液体流路システムの概要を示す図である。

本発明のマトリックス型可変液体流路システムは、ガラス基板102上に複数の刺激感応部材103を二次元マトリックス状に配置したマトリックス型可変液体流  
25 路121と、ガラス基板102上の物質を検出する検出手段122と、刺激感応部材103に刺激を与える刺激付与手段123と、検出手段122からの信号に基づき刺激付与手段123を制御する制御手段124とを備えている。

このマトリックス型可変液体流路121については、第七実施例で説明した基礎

台101に収まったマトリックス型可変液体流路を用いることができるので、ここではその説明は省略する。

検出手段122は、マトリックス型可変液体流路121のガラス基板102上の物質を検出するもので、対物レンズ122 aを含む顕微鏡122 b、検出装置122 c、解析装置122 dとで構成されている。

検出装置122 cとしては、ビデオカメラ、アバランシェフォトダイオードや光電子増倍管などの一般的なセンサーを用いることができる。また、解析装置122 dとしては、画像解析装置や一般的なセンサーの検出結果を解析する装置を用いることができる。そして、検出装置122 cとしてビデオカメラを用いた場合は、  
10 画像解析装置を解析装置122 dとして用い、検出装置122 cとして一般的なセンサーを用いた場合は、これらの検出結果を解析する装置を解析装置122 dとして用いることができる。

刺激付与手段123は、マトリックス型可変液体流路121のガラス基板102上に形成されている刺激感応部材103に刺激を与えるものである。

この刺激付与手段123については、第七実施例で説明した、スイッチ制御装置により刺激感応部材103に電圧をかけ、これを加熱する方法、スキャナーミラーや音響光学偏向器を用いてレーザー光を刺激感応部材103に照射する方法、デジタルミラーデバイスを用いてレーザー光やランプの光を刺激感応部材103に照射する方法などを用いることができるので、ここではその説明は省略する。

20 制御手段124は、検出手段122からの信号に基づき刺激付与手段123を制御するものである。そして、この制御手段124により、マトリックス型可変液体流路121のガラス基板102上に形成されている刺激感応部材103のどの位置の刺激感応部材を刺激するか、また、その刺激の強さ、時間などを制御することができる。

以上のような構成により、マトリックス型可変液体流路121のガラス基板102上  
25 を試料物質と熱感受性物質とを含む溶液が流れると、この流れを対物レンズ122 aでとらえ、これを光学顕微鏡122 bに導き、この光学顕微鏡122 bに接続されている検出装置122 cでデータとしてとらえる。そして、このデータを解析装置122 dで解析するようになっている。

そして、この解析装置122 dの解析結果をもとに、制御手段124によりスイッチ

制御して、ガラス基板102上の任意の刺激感応部材である金属片103を刺激する。そしてこの刺激により金属片103が加熱され、熱感受性物質がゾル化→ゲル転移によりゲル化し、ガラス基板102上に壁やバルブの構成物106を形成する。このようにして流路を自由に設計することができる。

- 5      そして、解析装置122 d として画像解析装置を用いた場合は、例えば、ガラス基板102上に壁やバルブの構成物106を形成する前の液体流路の状態を示す図 1 3 や、ガラス基板102上に壁やバルブの構造体106が構成され液体流路が設けられ、この流路に沿って目的試料物質107が流れている状態を示す図 1 7 のような画像が表示される。

- 10      この画像解析装置122 d で液体流路を目的物質が流れてきたのを確認した場合、制御手段124によりガラス基板102上の金属片103を刺激して、熱感受性物質をゲル化し、ガラス基板102上の任意の位置に壁やバルブの構成物106を形成して流路を変更したり、目的とする試料物質107を壁106で囲みガラス基板102上に滞留させたりすることができる。

- 15      なお、これらは、目視による制御に限らず、コンピュータなどにより自動的に制御する手段を用いてもよい。

また、液体流路を流れている試料物質や、ガラス基板102上に滞留している試料物質について、あらかじめ分析機能を搭載した解析装置122 d や、検出装置122 c に接続できる図示しない分析装置などにより分析するようにしても良い。

- 20      以上のように、本発明の実施の形態によれば、ガラス基板102上に複数の刺激感応部材103を二次元マトリックス状に配置したマトリックス型可変液体流路121 と、ガラス基板102上の物質を検出する検出手段122 と、刺激感応部材103に刺激を与える刺激付与手段123 と、検出手段122からの信号に基づき刺激付与手段123 を制御する制御手段124 とを備えたものであり、刺激を受けた刺激感応部材103に  
25      対応する位置で、可逆的にゾル→ゲル転移により壁やバルブの構造体106を構成することができるので、液体流路の形成が容易となる。そして、この刺激付与手段123を制御することにより容易に流路形状を変更できるので、異なった流路形状を有する液体流路の準備が不要となる。さらに、ガラス基板102上の任意の位置で物質の検出ができ、目的とする試料物質の分離や、分析が容易になる。



また、刺激感応部材103を刺激するのでゾルーゲル転移を起こす物質のゲル化速度が速くなり、刺激感応部材103に間隔があることにより任意の位置でのゲル化が容易となる。

そして、ゲル化領域が接続することで壁やパルプの構造体106を形成することができるのでガラス基板102上の流路を容易に変更でき、ガラス基板102上の任意の位置で物質の検出、目的とする試料物質の分離、分析が容易になる。

また、刺激感応部材103は蒸着、スパッタリング、化学気層成長（CVD）、めっき、プラズマ重合、又はスクリーン印刷により形成されるので、形成が容易であり、システムを安価にすることができる。

10 さらに、刺激付与手段123として、電圧をかけることまたは光を照射する手段を用いるので、刺激感応部材103に容易に刺激を付与することができ、刺激感応部材103の温度を調整でき、ゾルーゲル転移を容易に起こさせることができる。

そして、このような構成により、基板上の流路を容易に変更できるので、基板上の任意の位置で物質の検出ができ、目的とする試料物質の分離や、分析が容易  
15 になる。

次に、本発明の応用例1～4について、図19～26を用いて説明する。なお、本応用例において、上記第七、第八実施例と同じ部分については同じ符号を用いているのでそれらの説明は省略する。また、マトリックス型可変液体流路システムの構成については上記第八実施例と同じであるので、特に図示せず、説明も  
20 省略する。

#### （応用例1）

図19は、試料物質107aをゲル化した壁106で囲み、これを移動させて固定する状態を示す概念図である。

まず、図の上部の流入口（In1）からガラス基板102上に熱感受性物質および試料物質107aを含む溶液を流し、図の下部の流出口（Out2）から溶液を  
25 流出させる。そして、刺激感応部材である金属片103を刺激して熱感受性物質をゲル化し液体流路を形成する（図19においては、溶液が流れる液体流路は図示していない。）。

そして、この液体流路を流れてきた試料物質107aを検出手段122により認識し

た場合、この試料物質107aを囲むように金属片103にレーザーを照射し、熱感受性物質をゲル化させた壁106を形成する。次に、壁106により囲まれた試料物質107aを矢印で示すようにガラス基板102に図示しないヒーターが設けられている箇所へ移動して、壁106'で囲んだまま試料物質107a'を固定する。

- 5      この試料物質107aの移動は、まず、ゲル化している壁106の金属片の一つ右の金属片をゲル化させ、次にそれまででゲル化していた左部の壁106をゾル化させることによりおこなわれる。これにより、壁106全体を金属片1個分右に移動させることができる。これを複数回繰り返すことにより、試料物質107aを壁106で囲んだままガラス基板102のヒーターが設けられている箇所まで移動させること  
10      ができる。そして、ヒーターにより試料物質107a'に熱を加え、試料物質の熱変化を観察することができる。試料物質として、細胞、オルガネラ、核酸、タンパク質などの様々な生体物質を使用することができる。

(応用例2)

- 15      応用例1と同様の方法により、図20に示すように第1の試料物質107a'をゲル化した壁106'で囲み、図示しないヒーターが設けられている箇所で固定する。

- 20      次に、図20に示すように、図の上部の流入口(In2)からガラス基板102上に熱感受性物質および試料物質107bを含む溶液を流し、図の下部の流出口(Out3)から溶液を流出させる。そして、金属片103を刺激して熱感受性物質をゲル化し液体流路を形成する(図20においては、溶液が流れる液体流路は図示していない。)。そして、第2の試料物質107bを応用例1と同様の方法で、ゲル化した壁106で囲む。

- 25      この第2の試料物質107bを応用例1と同様の方法により、第1の試料物質107a'が固定されている壁106'の箇所まで移動させ、ゲル化した壁106および壁106'のそれぞれ一部を開き、第1の試料物質107a'と第2の試料物質107b'を同一の壁の中に存在させる。その後、図21に示すように、第1の試料物質107a'と第2の試料物質107b'が反応できるよう壁の大きさを変更する。そして、ヒーターの加熱や図示しない電界などにより第1の試料物質107aと第2の試料物質107bを接触させて化学反応させることができる。

試料物質として、細胞、オルガネラ、核酸、タンパク質などの様々な生体物質や薬剤を使用し、相互作用や反応を分析することもできる。

(応用例 3)

図 2 2 ~ 2 4 は、試料の一定量を採取し分析システムなどへ移送する状態を示す概念図である。

図 2 2 において、図の上部の流入口 (I n 1、I n 2) からガラス基板 102 上に熱感受性物質を含む溶液を流し、任意の位置の刺激感応部材である金属片 103 にレーザーを照射して液体流路を作製する。次に熱感受性物質およびサンプル 107 c が混合された溶液を図の上部の流入口 (I n 1、I n 2) からガラス基板 102 上に流すと、溶液はあらかじめ決められた流路を通過し、図の下部の流出口 (O u t 1、O u t 2) から溶液が流出する。溶液が流路を通過している状態を検出手段 122 で確認したら、流路の流入口側および流出口側の金属片 103 にレーザーを照射して熱感受性物質をゲル化し、液体の流入を止める。この状態を図 2 3 に示す。これによりガラス基板 102 上で一定量のサンプル 107 c を確保することができる。

次に、図 2 4 に示すように、図の左部の流入口 (I n 2') から移送用溶液をガラス基板 102 上に流して、図の右部の流出口 (O u t 2') から図示しない分析装置に移送できるように、金属片 103 にレーザーを照射して熱感受性物質をゲル化して新たな流路を形成し、流入口 (I n 2') から移送用溶液を流す。これにより、サンプル 107 c の一定量を流出口 (O u t 2') から分析装置に移送することができる。

(応用例 4)

図 2 5 および図 2 6 は、電気泳動による分子分離の概念を示す図である。

図 2 5 において、図 1 3 の左右一对の流入出口 104 c、104 d の代わりにガラス基板 102 を挟むように一对の電極 109、109 が設けられている。そして、図 2 5 の上部の流入口 (I n 1) からガラス基板 102 上に熱感受性物質を含む溶液を流し、図の下部の流出口 (O u t 1) から溶液を流出させるように刺激感応部材である金属片 103 にレーザーを照射して熱感受性物質をゲル化し液体流路を形成する。次に熱感受性物質およびサンプル 107 d が混合された溶液を図の上部の流入口

(In1) からガラス基板102上に流すと、溶液はあらかじめ決められた流路を通過する。

溶液が流路を通過している状態を検出手段122で確認したら、流路の流入口付近および流出口付近の金属片103にレーザーを照射して熱感受性物質をゲル化し、  
5 溶液がガラス基板102上を流れないようにする。この状態を図26に示す。

そして、この状態で一對の電極109、109に電界をかけることにより、電気泳動によりサンプル107dの分子分離をおこなうことができる。

以下、図27、図28に基づき、本発明の第九実施例の微小開口膜について説明する。201は微小開口膜であり、解析対象となる蛍光色素で標識化した蛍光性  
10 生体分子202を励起する励起光203を透過しない薄膜によって構成されている。この微小開口膜201は、ガラスなどの透明な基板204に結合されており、例えば、蒸着などの手段によって、アルミニウム、クロム、金、銀、ゲルマニウムなどの金属や、炭化シリコン(SiC)などの薄膜を基板204上に形成したものである。

この微小開口膜201には、前後左右方向にそれぞれ間隔dを隔てて等間隔に整然と配列した複数の微小開口205が形成されている。この微小開口205は直径 $\phi$ の円形に形成されている。なお、微小開口205は、必ずしも円形である必要はなく、  
15 微小開口205が円形でない場合は、直径 $\phi$ を微小開口205の最大開口幅とする。

そして、微小開口205の直径 $\phi$ は、励起光203の波長 $\lambda_{ex}$ よりも小さくなっている。なお、この直径 $\phi$ はできる限り小さいほうが好ましい。すなわち、直径 $\phi$ が  
20 小さいほど、後述するエバネッセント場206の領域が小さくなり、1分子レベルで蛍光性生体分子202を励起させるためには好都合であるため、好ましくは、直径 $\phi$ を200nm以下とし、さらに好ましくは20nm以下とする。

また、1分子レベルで蛍光性生体分子202が発する蛍光を検出するために、微小開口205の間隔dは、蛍光性生体分子202の蛍光207を検出する、後述する蛍光  
25 検出手段212を構成する光学顕微鏡の対物レンズ213の分解能と同じかそれよりも大きくなっている。すなわち、検出する光がコヒーレントでない場合、前記対物レンズ213の開口数NAに対し、蛍光207の波長を $\lambda_{em}$ とすると、その対物レンズ213の分解能は式 $0.61\lambda_{em}/NA$ で表されるので、微小開口205の間隔dは、  
 $d \geq 0.61\lambda_{em}/NA$ の式を満足する値になっている。例えば、蛍光207の波

長  $\lambda_{em}$  が 500 nm の場合、対物レンズ213の開口数 NA が 1.2 として、対物  
レンズ213の分解能は  $0.61 \lambda_{em} / NA \approx 250 \text{ nm}$  となる。したがって、開  
口数 NA が 1.2 の対物レンズ213を用いる場合は、微小開口205の間隔  $d$  が 25  
0 nm 以上の微小開口膜201を用いれば、1分子レベルで蛍光性生体分子202が発  
5 する蛍光を検出することができることになる。

つぎに、作用について説明する。図28に示すように、基板204の微小開口膜  
201の結合していない側から励起光203を入射すると、微小開口205で励起光203の  
染み出し、すなわちエバネッセント場206が発生する。このエバネッセント場206  
の大きさは、微小開口205の大きさと同程度であり、微小開口205に近接した励起  
10 光203の波長  $\lambda_{ex}$  よりも小さい領域にある蛍光性生体分子202が局所的に励起され  
、蛍光207を発する。また、多数の微小開口205が、前記光学顕微鏡の対物レンズ  
213の分解能よりも離れて配置しているため、それぞれの微小開口205によって励  
起された個々の蛍光性生体分子202の蛍光207を分離して1分子計測することが可  
能である。

15 なお、エバネッセント場206は、浸入長 150 nm 程度で減衰するので、エバ  
ネッセント場206の領域は微小開口205の面積に比例する。したがって、従来のよ  
うに、微小開口膜201を通さないで界面の全反射によるエバネッセント場を用い  
て蛍光性生体分子202を励起する場合に、蛍光性生体分子202を1分子レベルで検  
出するためには、対物レンズ213の分解能である直径 250 nm の範囲内に1分  
20 子のみが存在するように、蛍光性生体分子202の濃度を 50 nM 以下にする必要  
があった。しかし、本発明の微小開口膜201を用いれば、微小開口205の直径が 1  
00 nm のときは蛍光性生体分子202の濃度を 300 nM 程度まで、さらに、微  
小開口205の直径が 20 nm のときは蛍光性生体分子202の濃度を 8000 nM 程  
度、すなわち、従来の 100 ~ 1000 倍程度にまで増加させることができる。  
25 したがって、生体分子がガラス面などに非特異的に吸着することによる悪影響を  
従来の  $1/100$  程度まで飛躍的に減少させることができる。

以上のとおり、前記実施例の微小開口膜201は、微小開口205が設けられた光を  
透過しない薄膜からなるので、微小開口205の最大開口幅  $\phi$  を励起光203の波長  $\lambda_{ex}$   
よりも小さくし、この微小開口205に励起光203を照射すれば、この微小開口

205からエバネッセント場206が生じ、このエバネッセント場206を用いることで、励起光203の波長 $\lambda_{ex}$ より小さい領域で励起光203を蛍光性生体分子202に照射することが可能になる。

また、前記薄膜たる微小開口膜201は透明な基板204に結合されているので、基板204に微小開口膜201を支持することで微小開口膜201の製造性と取り扱い性を向上させることができる。また、基板204は透明なので励起光203の透過を妨げることがない。

また、前記微小開口205は複数設けられ略等間隔に配列されているので、複数の微小開口205のうちの任意の微小開口205において蛍光性生体分子202の蛍光207を観察することができるので、蛍光検出手段の位置合わせが容易になる。また、微小開口205の間隔 $d$ を蛍光検出手段の分解能と同じか又は蛍光検出手段の分解能よりも大きくすれば、それぞれの微小開口205によって励起された個々の蛍光性生体分子202の蛍光207を分離して、1分子レベルで生体分子間相互作用を検出することができる。

さらに、前記微小開口205の最大開口幅たる直径 $\phi$ は200nm以下であるので、微小開口205の直径 $\phi$ を励起光203の波長 $\lambda_{ex}$ より小さくすることができる。

つぎに、本発明の第十実施例の生体分子間相互作用解析装置について、図29、図30を参照して説明する。この生体分子間相互作用解析装置は、前記微小開口膜201を用い、蛍光相関分光法(FCS; Fluorescence Correlation Spectroscopy)によって蛍光性生体分子202が発する蛍光207の強度や、蛍光性生体分子202の拡散係数を求めるための装置である。なお、微小開口膜201の構成は前記実施例と同様であるので、同じ符号を付しその詳細な説明を省略する。

211は、励起光を発生する励起光発生手段たるレーザーである。なお、レーザー211の代わりにランプを用いても良い。このレーザー211は、蛍光性生体分子202の励起光203を微小開口膜201に照射するように構成されている。蛍光性生体分子202が含まれる水溶液208は、基板204の微小開口膜201の結合している側と、カバーガラス209との間に保持されており、励起光203は基板204の微小開口膜201の結合していない側から照射されるように構成されている。

カバーガラス209の外側には、蛍光性生体分子202から発せられる蛍光207を検

出する蛍光検出手段212が備えられている。この蛍光検出手段212は、顕微鏡（図示せず）の対物レンズ213、光学フィルター214、ピンホール215、検出器216を備えている。対物レンズ213は蛍光性生体分子202から発せられる蛍光207を集め、光学フィルター214は散乱などの背景光を取り除き、蛍光207のみを通過させるように配置されている。また、ピンホール215は、単一の微小開口205からの蛍光207を検出するために配置されるものであって、ピンホール215の穴の大きさは、対物レンズ213の分解能×倍率程度となっている。なお、対物レンズ213の分解能は、前述のとおり、対物レンズ213の開口数NAに対し、式  $0.61 \lambda_{em} / NA$  で表される。そして、ピンホール215を通過した蛍光207は、高感度の検出器216で検出され、その検出信号はデジタルカウンターやデジタル相関器などで処理されて、従来のFCSの手法に従い解析されるように構成されている。

つぎに、上記生体分子間相互作用解析装置を用いた解析方法について説明する。まず、蛍光性生体分子202を含む水溶液208を微小開口膜201とカバーガラス209の間に加え、顕微鏡に装着する。微小開口205の裏面から励起光203を入射してエバネッセント場206を発生させる。蛍光性生体分子202がエバネッセント場206を通過すると励起されて蛍光207を発する。この蛍光207を対物レンズ213で集め、散乱などの背景光を光学フィルター214で除き、蛍光207のみを通過させる。そして、光学フィルター214を通過した蛍光207をピンホール215に通し、単一の微小開口205からの蛍光207のみを検出器216で検出する。その後、その検出信号は、デジタルカウンターやデジタル相関器などで処理して、従来のFCSの手法に従い解析される。

以上のとおり、前記実施例の生体分子間相互作用解析装置は、励起光203を発生する励起光発生手段たるレーザー211と、最大開口幅たる直径 $\phi$ が前記励起光203の波長 $\lambda_{ex}$ よりも小さい微小開口205が設けられた光を透過しない薄膜からなる微小開口膜201と、蛍光207を検出する蛍光検出手段212とを備えたものであり、直径 $\phi$ が励起光203の波長 $\lambda_{ex}$ よりも小さい微小開口膜201の微小開口205にレーザー211からの励起光203を照射し、この微小開口205に生じるエバネッセント場206を用いることで励起光203の波長 $\lambda_{ex}$ より小さい領域で励起光203を蛍光性生体分子202に照射することができ、この蛍光性生体分子202から発せられる蛍光

207を蛍光検出手段212で検出することができる。また、励起光203の波長 $\lambda_{ex}$ より小さい領域で励起光203を蛍光性生体分子202に照射することによって、蛍光性生体分子202の水溶液208中の濃度を高くすることができ、さらに、蛍光性生体分子202のガラス面たる基板204面への非特異的吸着の影響を抑えることができるので、生体分子間相互作用の検出、定量を確実に行うことができる。

また、前記微小開口205は複数設けられ等間隔に配列されているとともに、前記微小開口205の間隔 $d$ は前記蛍光検出手段212を構成する対物レンズ213の分解能と同じか又は対物レンズ213の分解能よりも大きいので、複数の微小開口205のうちの任意の微小開口205において蛍光性生体分子202の蛍光207を観察することができるので、蛍光検出手段212の位置合わせが容易になる。また、微小開口205の間隔は蛍光検出手段212を構成する対物レンズ213の分解能と同じか又は対物レンズ213の分解能よりも大きいので、それぞれの微小開口205によって励起された個々の蛍光性生体分子202の蛍光207を分離して、1分子レベルで生体分子間相互作用を検出することができる。

さらに、前記実施例の生体分子間相互作用解析方法は、励起光203の波長 $\lambda_{ex}$ よりも小さい微小開口205から前記励起光203によるエバネッセント場206を発生させ、このエバネッセント場206の領域をブラウン運動により通過する蛍光性生体分子202を励起させ、その蛍光性生体分子202の蛍光207を検出するので、励起光203の波長 $\lambda_{ex}$ より小さい領域で励起光203を蛍光性生体分子202に照射することができ、生体分子間相互作用を1分子レベルで検出、定量することができる。

つぎに、本発明の第十一実施例の生体分子間相互作用解析装置について、図31、図32を参照して説明する。この生体分子間相互作用解析装置は、前記微小開口膜201を用い、蛍光クロス相関分光法（FCCS；fluorescence Cross-correlation Spectroscopy）によって、それぞれ異なる蛍光波長をもつ蛍光分子で標識した蛍光性生体分子202a，202bが発する蛍光207（207a，207b）から蛍光性生体分子202a，202bの生体分子間相互作用を検出するための装置である。なお、前記実施例と同様の部分には同じ符号を付しその詳細な説明を省略する。

211は、励起光を発生する励起光発生手段たるレーザーである。なお、レーザ



ー211の代わりにランプを用いても良い。このレーザー211は、2種類の蛍光性生体分子202 a, 202 bに共通な励起光203を微小開口膜201に照射するように構成されている。蛍光性生体分子202 a, 202 bが含まれる水溶液208は、基板204の微小開口膜201の結合している側と、カバーガラス209との間に保持されており、励起  
5 光203は基板204の微小開口膜201の結合していない側から照射されるように構成されている。

カバーガラス209の外側には、蛍光性生体分子202 a, 202 bから発せられる蛍光207 (207 a, 207 b)を検出する蛍光検出手段221が備えられている。この蛍光検出手段221は、顕微鏡(図示せず)の対物レンズ213, ピンホール215, ダイクロイックミラー222, 光学フィルター214 a, 214 b, 検出器216 a, 216 bを備え  
10 ている。対物レンズ213は蛍光性生体分子202 a, 202 bから発せられる蛍光207 (207 a, 207 b)を集め、ピンホール215は、対物レンズ213で集められた蛍光207の中から単一の微小開口205からの蛍光207 (207 a, 207 b)を検出するために配置されるものである。なお、ピンホール215の穴の大きさは、対物レンズ213の分解能×倍率程度となっている。なお、対物レンズ213の分解能は、前述のとおり  
15 分解能×倍率程度となっている。なお、対物レンズ213の開口数NAに対し、式 $0.61 \lambda_{em}/NA$ で表される。

ダイクロイックミラー222は、特定の波長だけを透過させ、その他の波長を反射するものであり、ここでは、ピンホール215を通過した蛍光207のうち、蛍光性生体分子202 aから発せられた蛍光207 aを透過させ、蛍光性生体分子202 bから  
20 発せられた蛍光207 bを反射するように構成されている。また、光学フィルター214 a, 214 bは、ダイクロイックミラー222で透過、反射された蛍光207 a, 207 bを含む光の中から、散乱などの背景光を取り除き、蛍光207 a, 207 bのみをそれぞれ通過させるように配置されている。そして、光学フィルター214 a, 214 bを通過した蛍光207 a, 207 bは、それぞれ高感度の検出器216 a, 216 bで検出さ  
25 れ、その検出信号はデジタルカウンターやデジタル相関器などで処理されて、従来のFCCSの手法に従い蛍光207 a, 207 bのクロス相関をとることにより、蛍光性生体分子202 aと蛍光性生体分子202 bの結合を検出するように構成されている。

つぎに、上記生体分子間相互作用解析装置を用いた解析方法について説明する

。まず、蛍光性生体分子202 a, 202 bを含む水溶液208を微小開口膜201とカバーガラス209の間に加え、顕微鏡に装着する。微小開口205の裏面から励起光207を入射してエバネッセント場206を発生させる。蛍光性生体分子202 a, 202 bがエバネッセント場206を通過すると励起されてそれぞれ蛍光207 a, 207 bを発する

5   。この蛍光207 a, 207 bを対物レンズ213で集め、ピンホール215に通し、単一の微小開口205からの蛍光207 a, 207 bのみを通過させる。そして、ピンホール215を通過した蛍光207 a, 207 bを、ダイクロイックミラー222を用いて分離する。すなわち、蛍光207 aはダイクロイックミラー222を透過し、蛍光207 bはダイクロイックミラー222で反射される。そして、ダイクロイックミラー222で分離され

10   た蛍光207 a, 207 bは、それぞれ光学フィルター214 a, 214 bによって散乱などの背景光が除かれる。光学フィルター214 a, 214 bを通過した蛍光207 a, 207 bは、その後、それぞれ検出器216 a, 216 bによって検出される。

なお、図31の中央の微小開口205のように、蛍光性生体分子202 aと蛍光性生体分子202 bが結合している場合は、蛍光性生体分子202 aと蛍光性生体分子202 bの蛍光207 a, 207 bが同時に観察される。一方、図31の両端の微小開口205のように、2つの蛍光性生体分子202 a, 202 bが結合していない場合は、一方の

15   蛍光207（蛍光207 a又は蛍光207 b）しか検出されない。その検出信号はデジタルカウンタやデジタル相関器などで処理されて、従来のFCCSの手法に従い、蛍光207 a, 207 bのクロス相関をとることにより、蛍光性生体分子202 aと

20   蛍光性生体分子202 bの結合を検出する。

以上のとおり、前記実施例の生体分子間相互作用解析装置は、励起光203を発生する励起光発生手段たるレーザー211と、最大開口幅たる直径 $\phi$ が前記励起光203の波長 $\lambda_{ex}$ よりも小さい微小開口205が設けられた光を透過しない薄膜からなる微小開口膜201と、蛍光207（207 a, 207 b）を検出する蛍光検出手段221とを

25   備えたものであり、直径 $\phi$ が励起光203の波長 $\lambda_{ex}$ よりも小さい微小開口膜201の微小開口205にレーザー211からの励起光203を照射し、この微小開口205に生じるエバネッセント場206を用いることで励起光203の波長 $\lambda_{ex}$ より小さい領域で励起光203を蛍光性生体分子202 a, 202 bに照射することができ、この蛍光性生体分子202 a, 202 bから発せられる蛍光207 a, 207 bを蛍光検出手段221で検出する

ことができる。また、励起光203の波長 $\lambda_{ex}$ より小さい領域で励起光203を蛍光性生体分子202 a, 202 bに照射することによって、蛍光性生体分子202 a, 202 bの水溶液208中の濃度を高くすることができ、さらに、蛍光性生体分子202 a, 202 bのガラス面たる基板204面への非特異的吸着の影響を抑えることができるので、

5 生体分子間相互作用の検出、定量を確実に行うことができる。

また、前記微小開口205は複数設けられ等間隔に配列されているとともに、前記微小開口205の間隔dは前記蛍光検出手段221を構成する対物レンズ213の分解能と同じか又は対物レンズ213の分解能よりも大きいので、複数の微小開口205のうちの任意の微小開口205において蛍光性生体分子202 a, 202 bの蛍光207 a,

10 207 bを観察することができるので、蛍光検出手段221の位置合わせが容易になる。また、微小開口205の間隔は蛍光検出手段221を構成する対物レンズ213の分解能と同じか又は対物レンズ213の分解能よりも大きいので、それぞれの微小開口205によって励起された個々の蛍光性生体分子202 a, 202 bの蛍光207 a, 207 bを分離して、1分子レベルで生体分子間相互作用を検出することができる。

さらに、前記実施例の生体分子間相互作用解析方法は、励起光203の波長 $\lambda_{ex}$ よりも小さい微小開口205から前記励起光203によるエバネッセント場206を発生させ、このエバネッセント場206の領域をブラウン運動により通過する蛍光性生体分子202 a, 202 bを励起させ、その蛍光性生体分子202 a, 202 bの蛍光207 a,

15 207 bを検出するので、励起光203の波長 $\lambda_{ex}$ より小さい領域で励起光203を蛍光性生体分子202 a, 202 bに照射することができ、生体分子間相互作用を1分子レベルで検出、定量することができる。

つぎに、本発明の第十二実施例の生体分子間相互作用解析装置について、図33、図34を参照して説明する。この生体分子間相互作用解析装置は、前記微小開口膜201を用い、1分子蛍光イメージ法、或いは、多分子の蛍光顕微定量法によって、それぞれ異なる蛍光波長をもつ蛍光分子で標識した蛍光性生体分子202 a, 202 bを用いて、蛍光性生体分子202 bが発する蛍光207 bから蛍光性生体分子202 a, 202 bの生体分子間相互作用を検出するための装置である。なお、前記

25 実施例と同様の部分には同じ符号を付しその詳細な説明を省略する。

211は、励起光を発生する励起光発生手段たるレーザーである。なお、レーザ

ー211の代わりにランプを用いても良い。このレーザー211は、励起光203を微小開口膜201に照射するように構成されている。蛍光性生体分子202 a は、微小開口205に付着しており、蛍光性生体分子202 b が含まれる水溶液208は、基板204の微小開口膜201の結合している側と、カバーガラス209との間に保持されている。そして、励起光203は基板204の微小開口膜201の結合していない側から照射されるように構成されている。

カバーガラス209の外側には、蛍光性生体分子202 a , 202 b から発せられる蛍光207 (207 a , 207 b ) を検出する蛍光検出手段231が備えられている。この蛍光検出手段231は、顕微鏡 (図示せず) の対物レンズ213, 光学フィルター214, カメラ232を備えている。対物レンズ213は蛍光性生体分子202 a , 202 b から発せられる蛍光207 (207 a , 207 b ) を集め、光学フィルター214は散乱などの背景光を取り除き、蛍光207 (207 a , 207 b ) のみを通過させるように配置されている。なお、対物レンズ213の分解能は、前述のとおり、対物レンズ213の開口数NAに対し、式  $0.61 \lambda_{em} / NA$  で表される。そして、光学フィルター214を通過した蛍光207 (207 a , 207 b ) の像は、高感度のカメラ232で検出されるように構成されている。

つぎに、上記生体分子間相互作用解析装置を用いた解析方法について説明する。まず、蛍光性生体分子202 a を含む水溶液を微小開口膜201とカバーガラス209の間に加え、蛍光性生体分子202 a を微小開口205に付着させる。微小開口205に付着しなかった蛍光性生体分子202 a を洗い流した後、別の蛍光性生体分子202 b を含む水溶液208を微小開口膜201とカバーガラス209の間に加え、顕微鏡に装着する。微小開口205の裏面から励起光207を入射してエバネッセント場206を発生させる。

まず、蛍光性生体分子202 a を励起して、その蛍光207 a の像をカメラ232で観察して蛍光性生体分子202 a の位置を確認しておく。1分子蛍光イメージング法の場合は、個々の微小開口205に関し、付着した蛍光性生体分子202 a の数が1以下になるように調節する。多分子の蛍光顕微定量法の場合は、個々の微小開口205に関し、付着した蛍光性生体分子202 a の数を1以上の任意の値に設定することが可能である。

つぎに、別の蛍光性生体分子202bを励起して、その蛍光207bの像をカメラ232で捉えることによって、微小開口205に付着した蛍光性生体分子202aと別の蛍光性生体分子202bの結合、解離などの相互作用の様子を観察する。なお、1分子蛍光イメージング法の場合は、個々の微小開口205ごとに解析を行う。また、  
5、1分子蛍光イメージング法で用いる装置と同じ装置を用いて、観測する分子を多くすれば多分子の蛍光顕微定量法による観測を行うことができるが、多分子の蛍光顕微定量法の場合は、複数の微小開口205からの蛍光207bを同時に検出する。したがって、多分子の蛍光顕微定量法の場合は、カメラ232以外に、光電子倍增管などの検出器を用いてもよい。以上の方法で、生体分子間相互作用の結合速度定数、解離速度定数、解離定数などを得ることができる。

以上のとおり、前記実施例の生体分子間相互作用解析装置は、励起光203を発生する励起光発生手段たるレーザー211と、最大開口幅たる直径 $\phi$ が前記励起光203の波長 $\lambda_{ex}$ よりも小さい微小開口205が設けられた光を透過しない薄膜からなる微小開口膜201と、蛍光207(207a, 207b)を検出する蛍光検出手段231とを  
15備えたものであり、直径 $\phi$ が励起光203の波長 $\lambda_{ex}$ よりも小さい微小開口膜201の微小開口205にレーザー211からの励起光203を照射し、この微小開口205に生じるエバネッセント場206を用いることで励起光203の波長 $\lambda_{ex}$ より小さい領域で励起光203を蛍光性生体分子202a, 202bに照射することができ、この蛍光性生体分子202a, 202bから発せられる蛍光207a, 207bを蛍光検出手段231で検出する  
20ことができる。また、励起光203の波長 $\lambda_{ex}$ より小さい領域で励起光203を蛍光性生体分子202a, 202bに照射することによって、蛍光性生体分子202a, 202bの水溶液208中の濃度を高くすることができ、さらに、蛍光性生体分子202a, 202bのガラス面たる基板204面への非特異的吸着の影響を抑えることができるので、生体分子間相互作用の検出、定量を確実に行うことができる。

25 また、前記微小開口205は複数設けられ等間隔に配列されているとともに、前記微小開口205の間隔dは前記蛍光検出手段231を構成する対物レンズ213の分解能と同じか又は対物レンズ213の分解能よりも大きいので、複数の微小開口205のうちの任意の微小開口205において蛍光性生体分子202a, 202bの蛍光207を観察することができるので、蛍光検出手段231の位置合わせが容易になる。また、微

小開口205の間隔は蛍光検出手段231を構成する対物レンズ213の分解能と同じか又は対物レンズ213の分解能よりも大きいので、それぞれの微小開口205によって励起された個々の蛍光性生体分子202 a, 202 bの蛍光207 a, 207 bを分離して、1分子レベルで生体分子間相互作用を検出することができる。

- 5      さらに、前記実施例の生体分子間相互作用解析方法は、励起光203の波長 $\lambda_{ex}$ よりも小さい微小開口205から前記励起光203によるエバネッセント場206を発生させ、この微小開口205に付着させた第一の蛍光性生体分子202 aと、前記エバネッセント場206の領域にあって前記第一の蛍光性生体分子202 aと相互作用する第二の蛍光性生体分子202 bとを励起させ、これら第一の蛍光性生体分子202 aと第二の  
10    蛍光性生体分子202 bの蛍光207 a, 207 bをそれぞれ検出するので、励起光203の波長より小さい領域で励起光203を蛍光性生体分子202 a, 202 bに照射することができ、生体分子間相互作用を1分子レベルで検出、定量することができる。

- 以上、上記実施例で詳細に説明したとおり、本発明は、微小開口からのエバネッセント場の生成、1分子蛍光イメージング法、FCS、FCCSなどの既知の  
15    方法を巧みに組み合わせることにより、従来の原理的な問題を解決して水溶液中に従来の限界濃度の100～1000倍もの高濃度の分子を加えることを可能にしたほか、ガラス面などへの非特異的吸着の影響を従来の1/100程度にまで抑えることを可能にしている。

- そして、本発明は、生体分子間相互作用を1分子レベルで高感度に定量することを可能とするものであって、生物学、医学、薬学などの広範な分野で利用可能  
20    である。特に、ポストゲノム研究として、タンパク質間相互作用の研究が重要になっているが、本発明により、生体分子間相互作用、特に、タンパク質間相互作用を1分子レベルで高感度に検出し、機能解析を行うことが可能になる。そして、本発明によれば、従来は不可能であった結合定数が $10^{-6}$ Mよりも小さい弱い相  
25    互作用を検出することができる。本発明は、DNAチップやタンパク質チップに直ちに応用可能であり、タンパク質間相互作用の解析に大きな威力を発揮するであろう。

なお、本発明は上記の実施例に限定されるものでなく、本発明の要旨の範囲内において種々の変形実施が可能である。例えば、微小開口が多数ある微小開口膜

を例にとって説明したが、微小開口が1つの微小開口膜であってもよい。

## 請 求 の 範 囲

1. 基板に形成された液体流路を流れる液体に刺激を付与する刺激付与手段を備え、この刺激付与手段からの刺激によって前記液体の流れを制御するように構成したマイクロシステムにおいて、前記刺激付与手段が前記液体に付与する刺激の量を電氣的に制御する制御手段を備えたことを特徴とするマイクロシステム。
2. 前記刺激付与手段は熱源又は光源であって、前記刺激の量を検知する刺激検知手段を備え、この刺激検知手段からの信号に基づき前記制御手段が前記刺激付与手段を制御するように構成したことを特徴とする請求項 1 記載のマイクロシステム。
3. 前記熱源はマイクロヒーターであることを特徴とする請求項 2 記載のマイクロシステム。
4. 前記刺激検知手段は前記液体流路に設けられた熱センサーであることを特徴とする請求項 2 記載のマイクロシステム。
5. 前記熱センサーは熱電対であることを特徴とする請求項 4 記載のマイクロシステム。
6. 前記熱センサーは熱感応性半導体又は赤外線感応性センサーであることを特徴とする請求項 4 記載のマイクロシステム。
7. 前記光源は前記基板に設置された発光素子であることを特徴とする請求項 2 記載のマイクロシステム。
8. 前記発光素子は前記基板に埋め込まれたことを特徴とする請求項 7 記載のマイクロシステム。
9. 前記発光素子は前記基板の外に配置されたことを特徴とする請求項 7 記載のマイクロシステム。
10. 前記発光素子からの光を導入する光導入路を前記液体流路が形成された前記基板の面と水平に形成したことを特徴とする請求項 9 記載のマイクロシステム。
11. 前記発光素子は複数個設置されたことを特徴とする請求項 7 記載のマイクロシステム。



- 1 2. 前記液体にエネルギーを付与するエネルギー付与手段と、このエネルギー付与手段からのエネルギーによって変化を生じる物質の変化を検知する変化検知手段を備え、この変化検知手段からの信号に基づき前記制御手段が前記刺激付与手段を制御するように構成したことを特徴とする請求項 1 記載のマイクロシステム。
- 5 1 3. 前記エネルギー付与手段からのエネルギーを導入するエネルギー導入路を前記基板の面と水平に形成したことを特徴とする請求項 1 2 記載のマイクロシステム。
- 1 4. 前記変化検知手段は蛍光検知素子又は受光素子であることを特徴とする請求項 1 2 記載のマイクロシステム。
- 1 5. 前記蛍光検知素子又は前記受光素子は前記基板の面と水平に配置されたことを特徴とする請求項 1 4 記載のマイクロシステム。
- 1 6. 前記蛍光検知素子又は前記受光素子は前記液体流路の上方に配置されたことを特徴とする請求項 1 4 記載のマイクロシステム。
- 1 7. 前記基板を載置する載置台を備え、この載置台に前記基板の位置を決める位置決め手段を備えたことを特徴とする請求項 1 記載のマイクロシステム。
- 1 8. 基板上に複数の刺激感応部材を二次元マトリックス状に配置したことを特徴とするマトリックス型可変液体流路。
- 1 9. 前記基板上の刺激感応部材が間隔をおいて配列されていることを特徴とする請求項 1 8 記載のマトリックス型可変液体流路。
- 2 0. 前記刺激感応部材の大きさが  $2\ \mu\text{m}$  以上  $20\ \mu\text{m}$  以下であることを特徴とする請求項 1 9 記載のマトリックス型可変液体流路。
- 2 1. 前記刺激感応部材が  $2\ \mu\text{m}$  以上  $20\ \mu\text{m}$  以下の間隔で配列されていることを特徴とする請求項 1 9 記載のマトリックス型可変液体流路。
- 2 2. 前記刺激感応部材が蒸着、スパッタリング、化学気相成長 (CVD)、めっき、プラズマ重合、又はスクリーン印刷により形成されたことを特徴とする請求項 1 9 記載のマトリックス型可変液体流路。
- 2 3. 前記刺激感応部材に、電圧をかけることまたは光を照射することにより刺激を付与するように構成したことを特徴とする請求項 1 8 記載のマトリックス型

可変液体流路。

24. 基板上に複数の刺激感応部材を二次元マトリックス状に配置したマトリックス型可変液体流路と、前記基板上の物質を検出する検出手段と、前記刺激感応部材に刺激を与える刺激付与手段と、前記検出手段からの信号に基づき前記刺激付与手段を制御する制御手段とを備えたことを特徴とするマトリックス型可変液体流路システム
25. 前記基板上の刺激感応部材が間隔をおいて配列されていることを特徴とする請求項24記載のマトリックス型可変液体流路システム。
26. 前記刺激感応部材の大きさが $2\mu\text{m}$ 以上 $20\mu\text{m}$ 以下であることを特徴とする請求項25記載のマトリックス型可変液体流路システム。
27. 前記刺激感応部材が $2\mu\text{m}$ 以上 $20\mu\text{m}$ 以下の間隔で配列されていることを特徴とする請求項25記載のマトリックス型可変液体流路システム。
28. 前記刺激感応部材が蒸着、スパッタリング、化学気相成長(CVD)、めっき、プラズマ重合、又はスクリーン印刷により形成されたことを特徴とする請求項25記載のマトリックス型可変液体流路システム。
29. 前記刺激付与手段として、前記刺激感応部材に電圧をかけることまたは光を照射することにより刺激を付与するように構成したことを特徴とする請求項24記載のマトリックス型可変液体流路システム。
30. 微小開口が設けられた光を透過しない薄膜からなることを特徴とする微小開口膜。
31. 前記薄膜は透明な基板に結合されていることを特徴とする請求項30記載の微小開口膜。
32. 前記微小開口は複数設けられ略等間隔に配列されていることを特徴とする請求項30記載の微小開口膜。
33. 前記微小開口の最大開口幅は $200\text{nm}$ 以下であることを特徴とする請求項30記載の微小開口膜。
34. 励起光を発生する励起光発生手段と、最大開口幅が前記励起光の波長よりも小さい微小開口が設けられた光を透過しない薄膜からなる微小開口膜と、蛍光を検出する蛍光検出手段とを備えたことを特徴とする生体分子間相互作用解析装

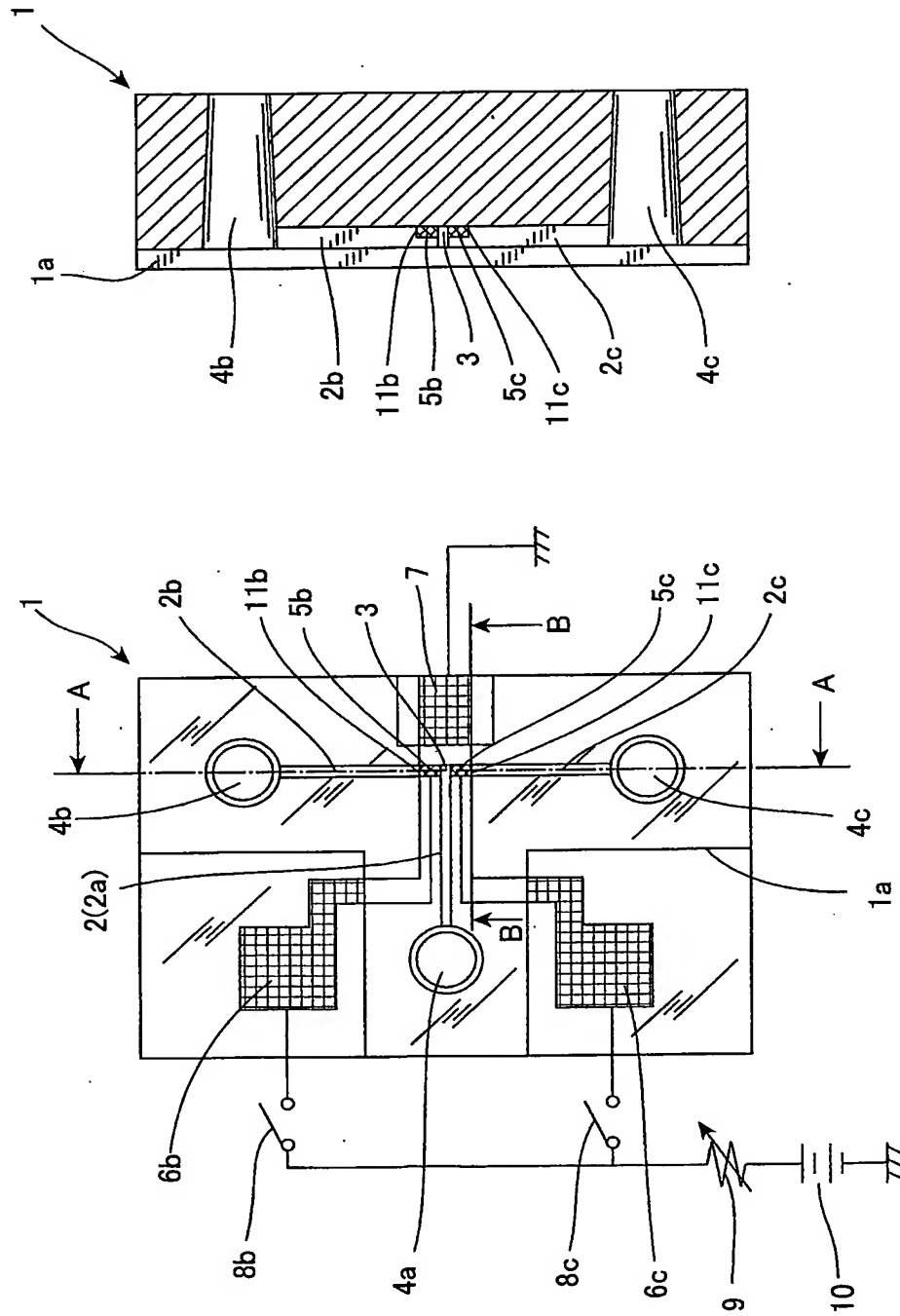
置。

35. 前記微小開口は複数設けられ等間隔に配列されているとともに、前記微小開口の間隔は前記蛍光検出手段の分解能と同じか又は前記蛍光検出手段の分解能よりも大きいことを特徴とする請求項34記載の生体分子間相互作用解析装置。

- 5 36. 励起光の波長よりも小さい微小開口から前記励起光によるエバネッセント場を発生させ、このエバネッセント場の領域をブラウン運動により通過する蛍光性生体分子を励起させ、その蛍光性生体分子の蛍光を検出することを特徴とする生体分子間相互作用解析方法。

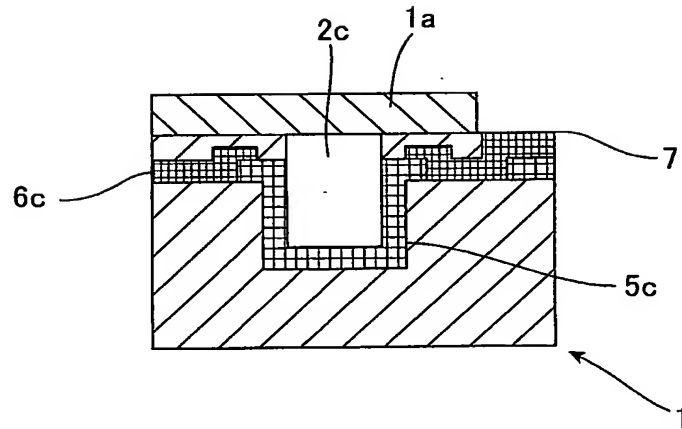
- 10 37. 励起光の波長よりも小さい微小開口から前記励起光によるエバネッセント場を発生させ、この微小開口に付着させた第一の蛍光性生体分子と、前記エバネッセント場の領域にあって前記第一の蛍光性生体分子と相互作用する第二の蛍光性生体分子とを励起させ、これら第一の蛍光性生体分子と第二の蛍光性生体分子の蛍光をそれぞれ検出することを特徴とする生体分子間相互作用解析方法。

【図 1】

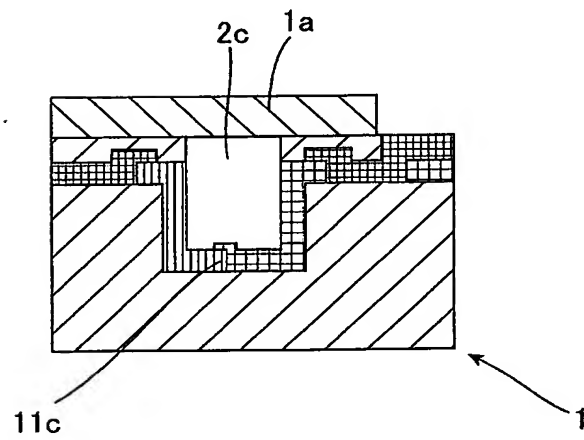


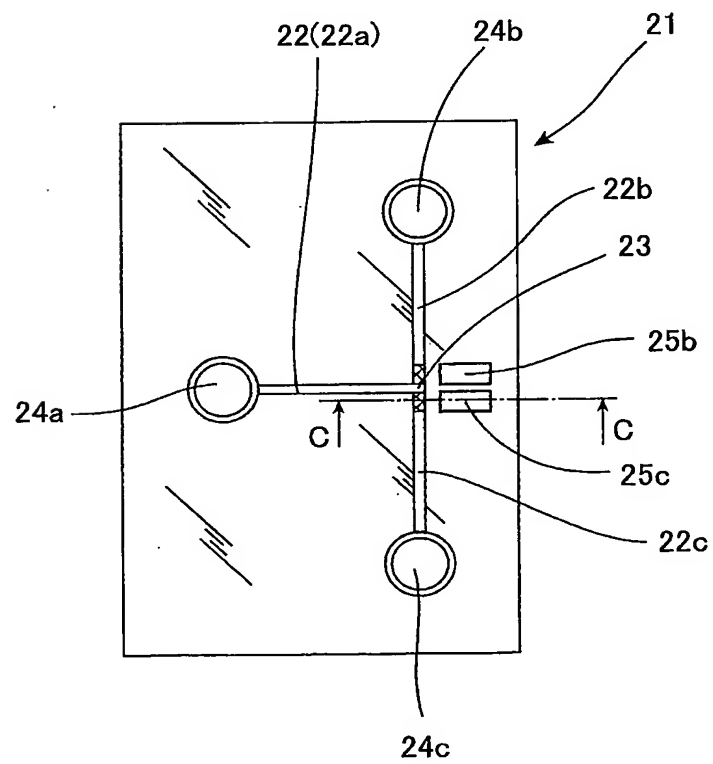
2/26

【図 2】



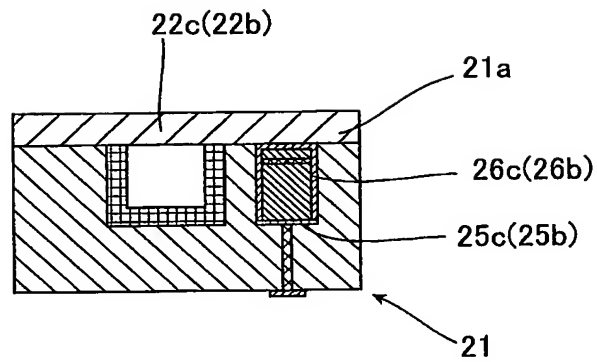
【図 3】



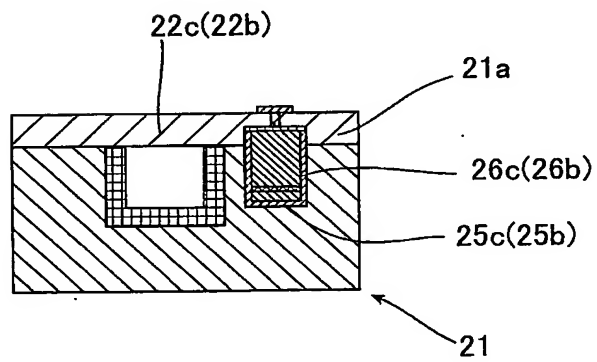


4/26

【図6】

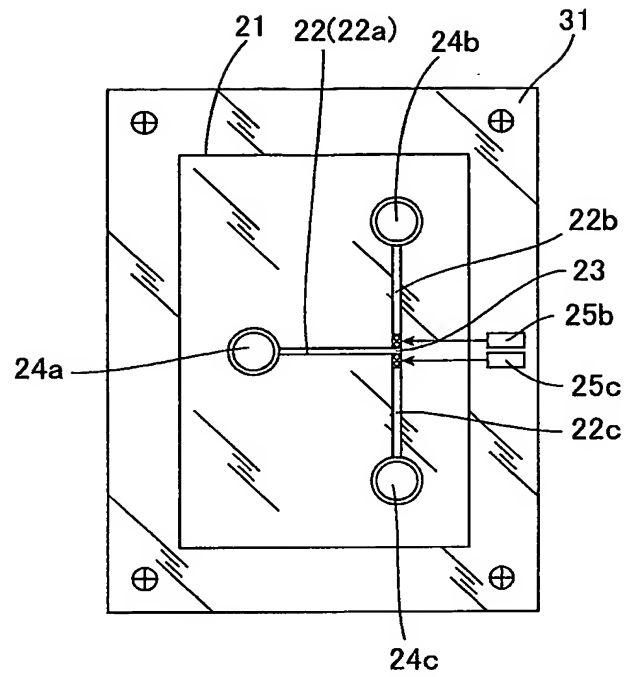


【図7】

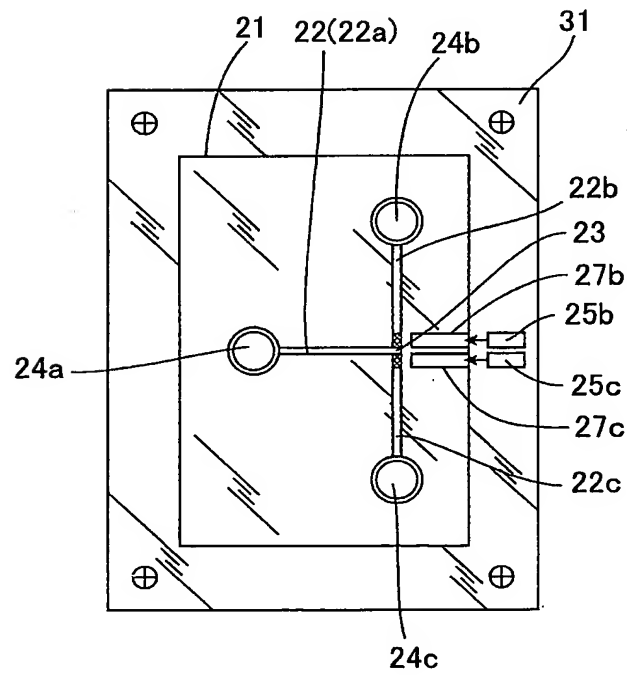


5/26

【図8】



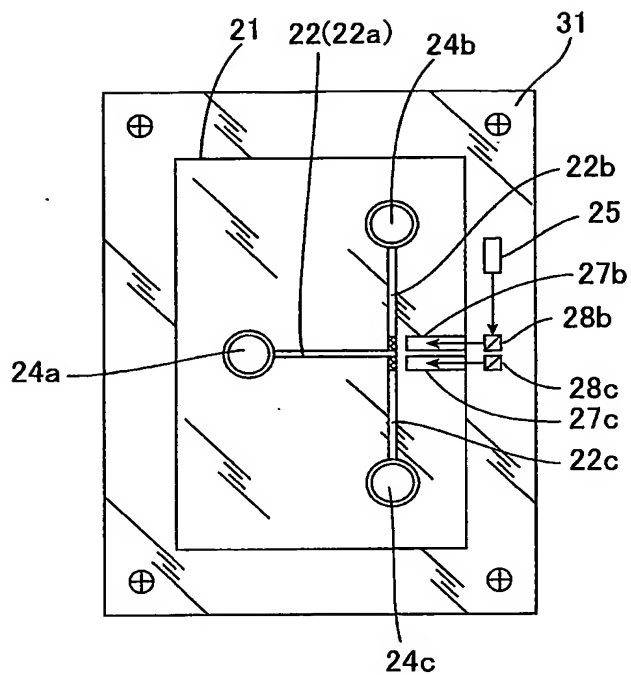
【図9】



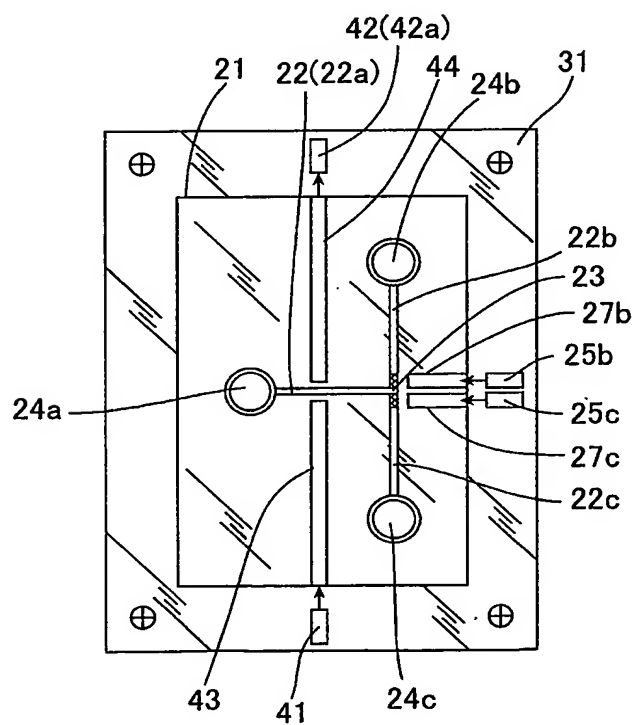


6/26

【図10】

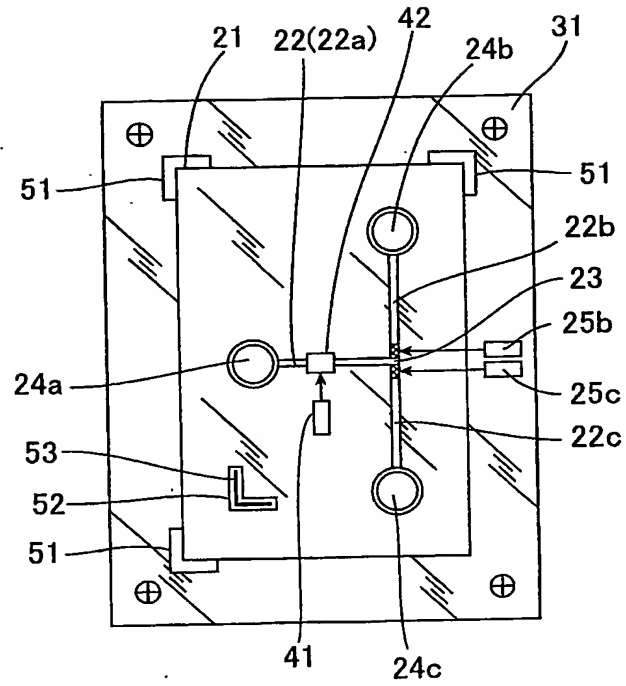


【図11】



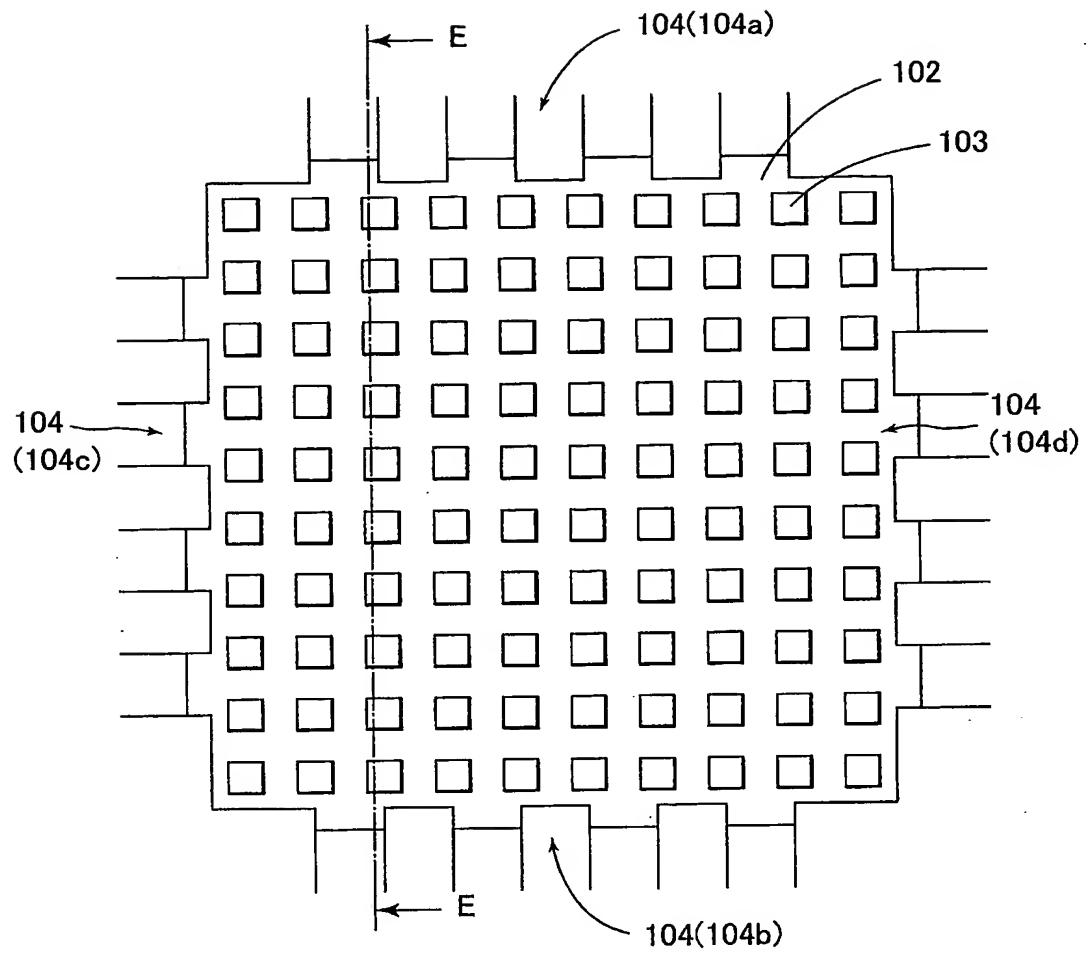
7/26

【図12】

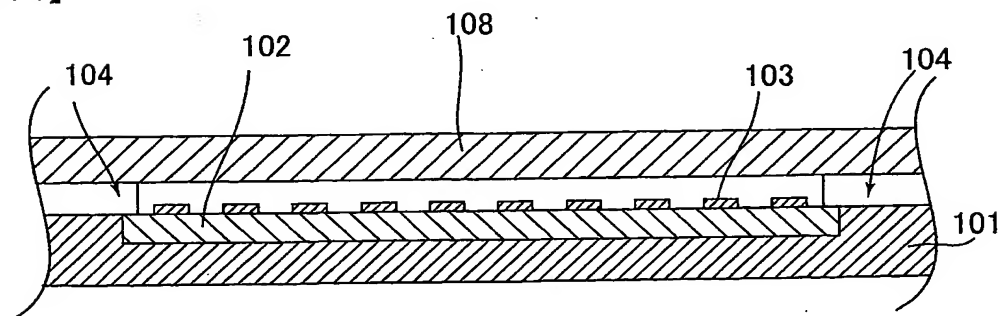


8/26

【図13】

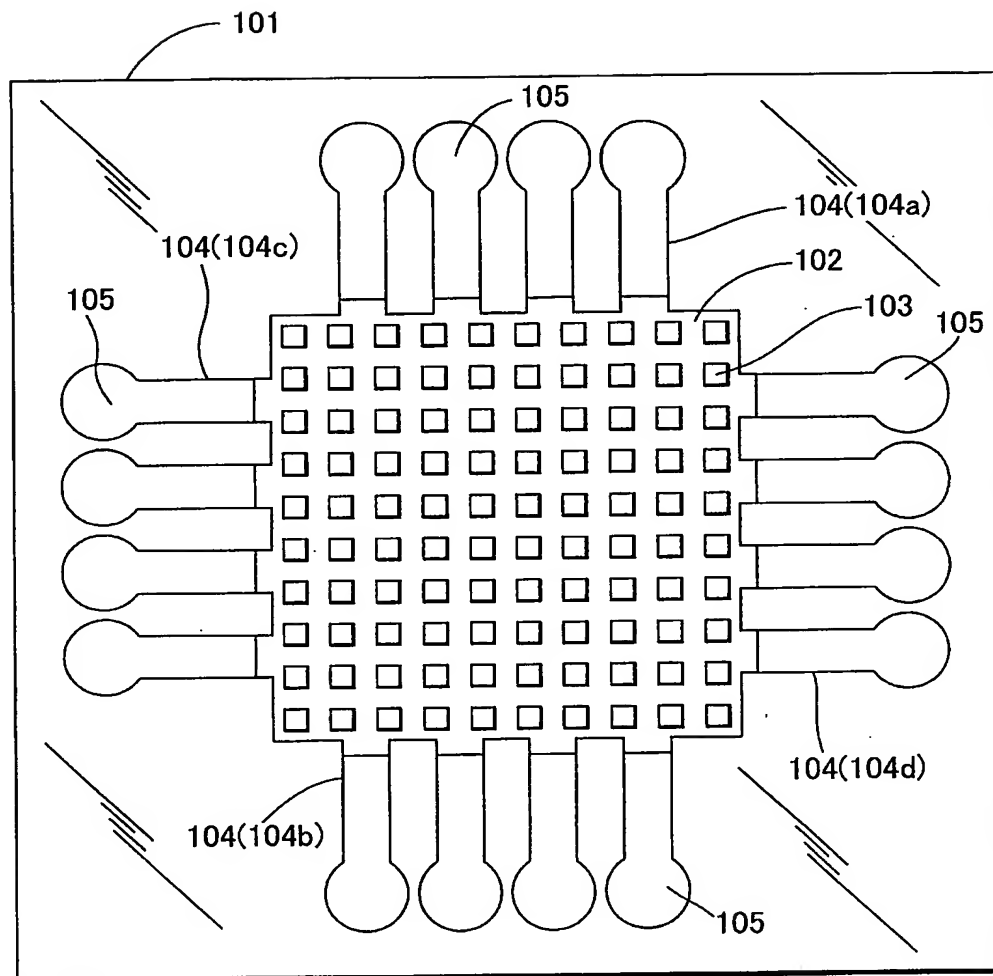


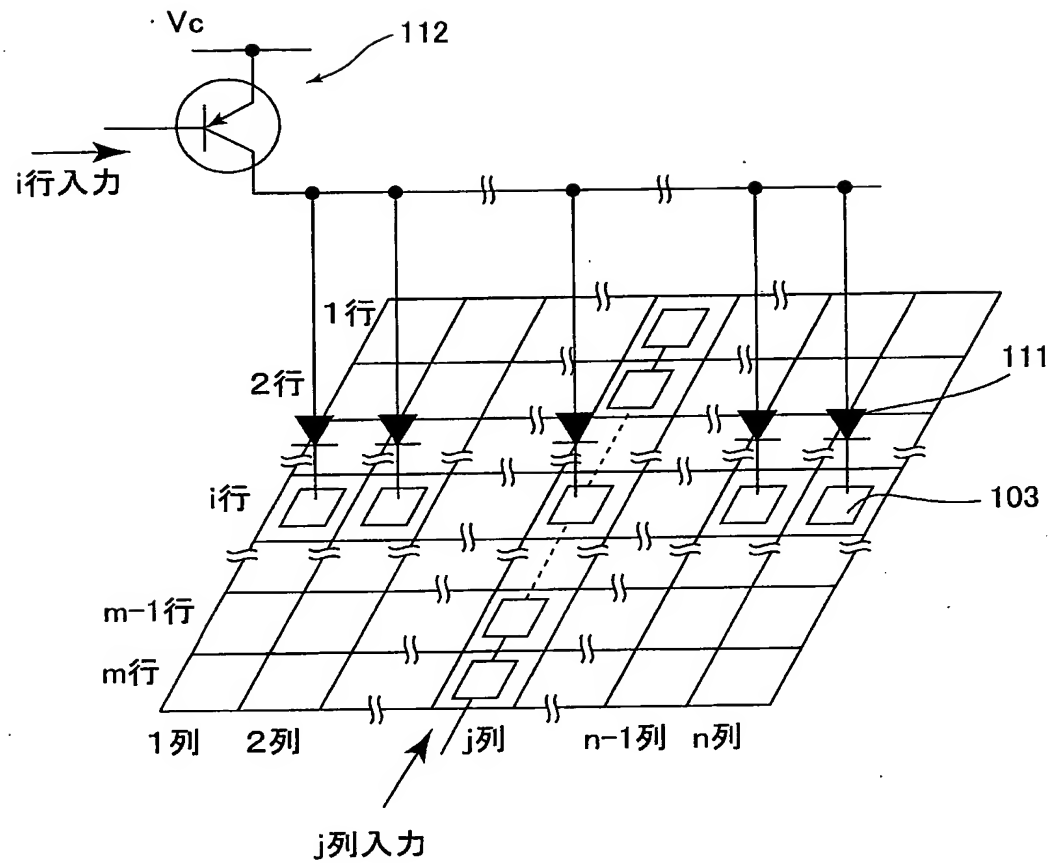
【図14】



9/26

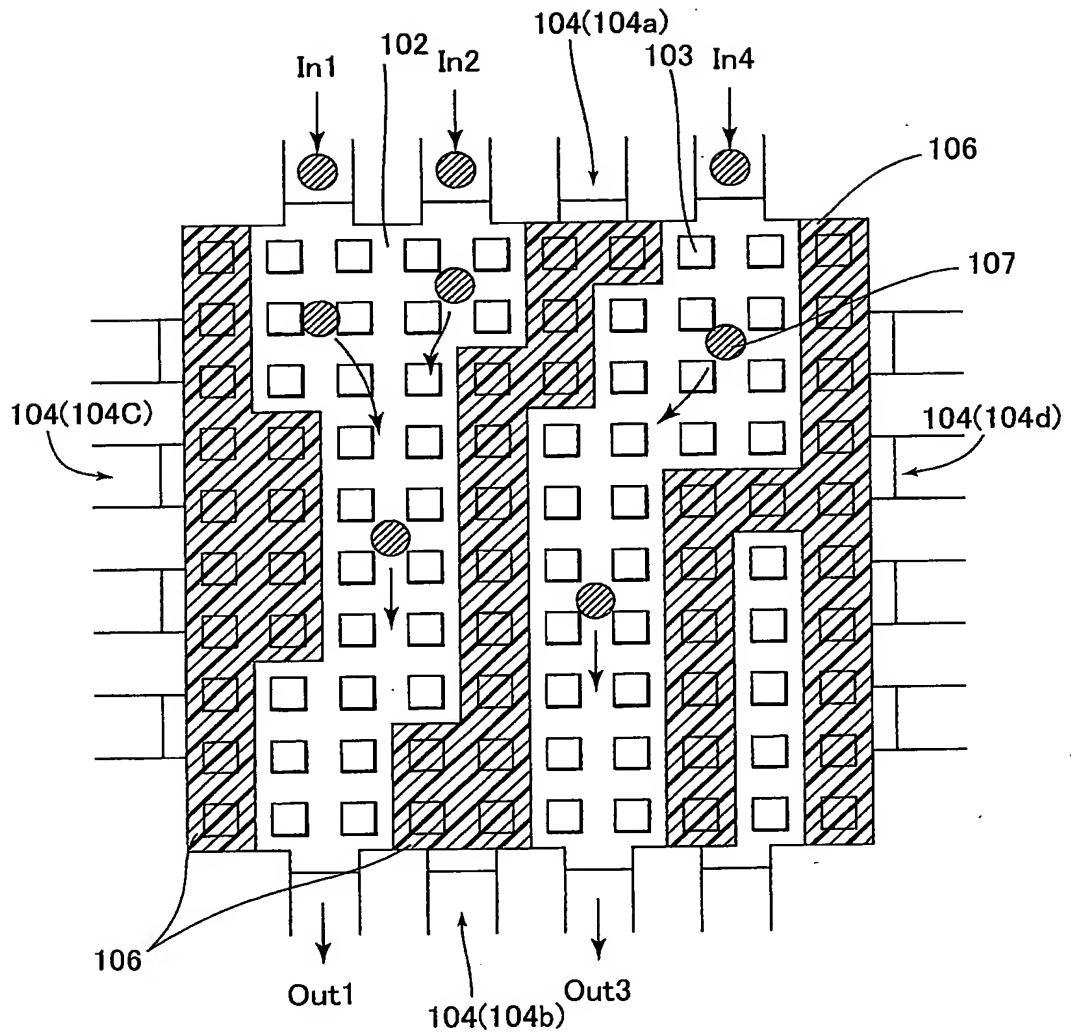
【図15】





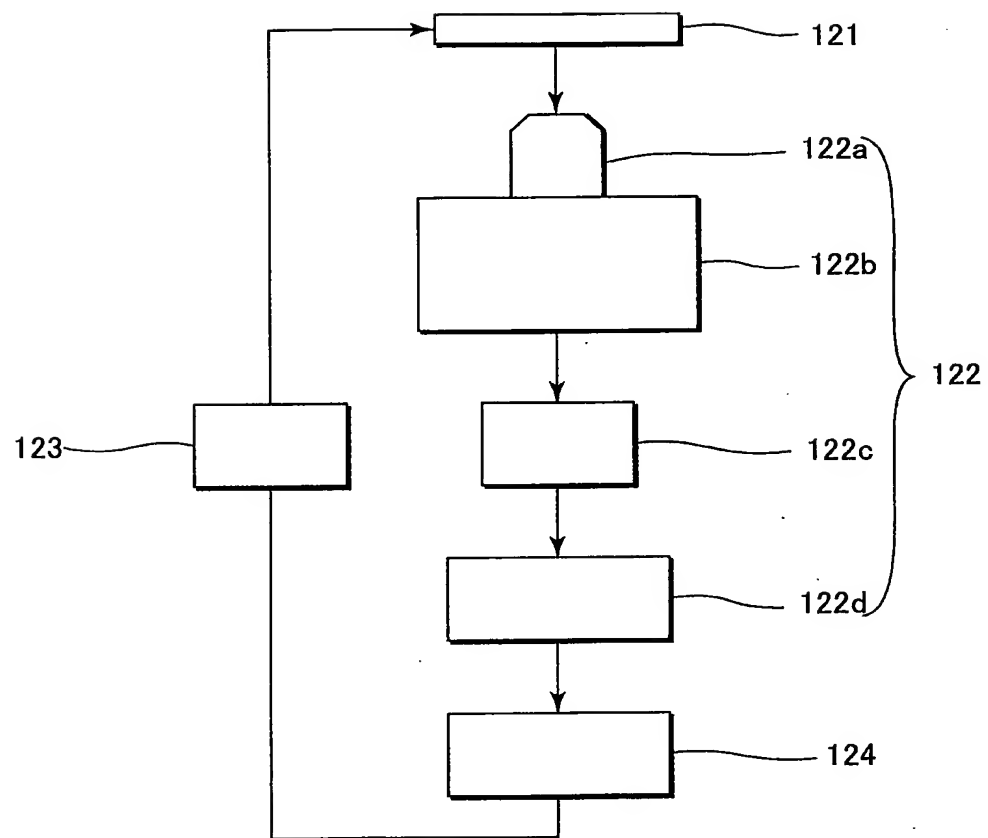
11/26

【図17】

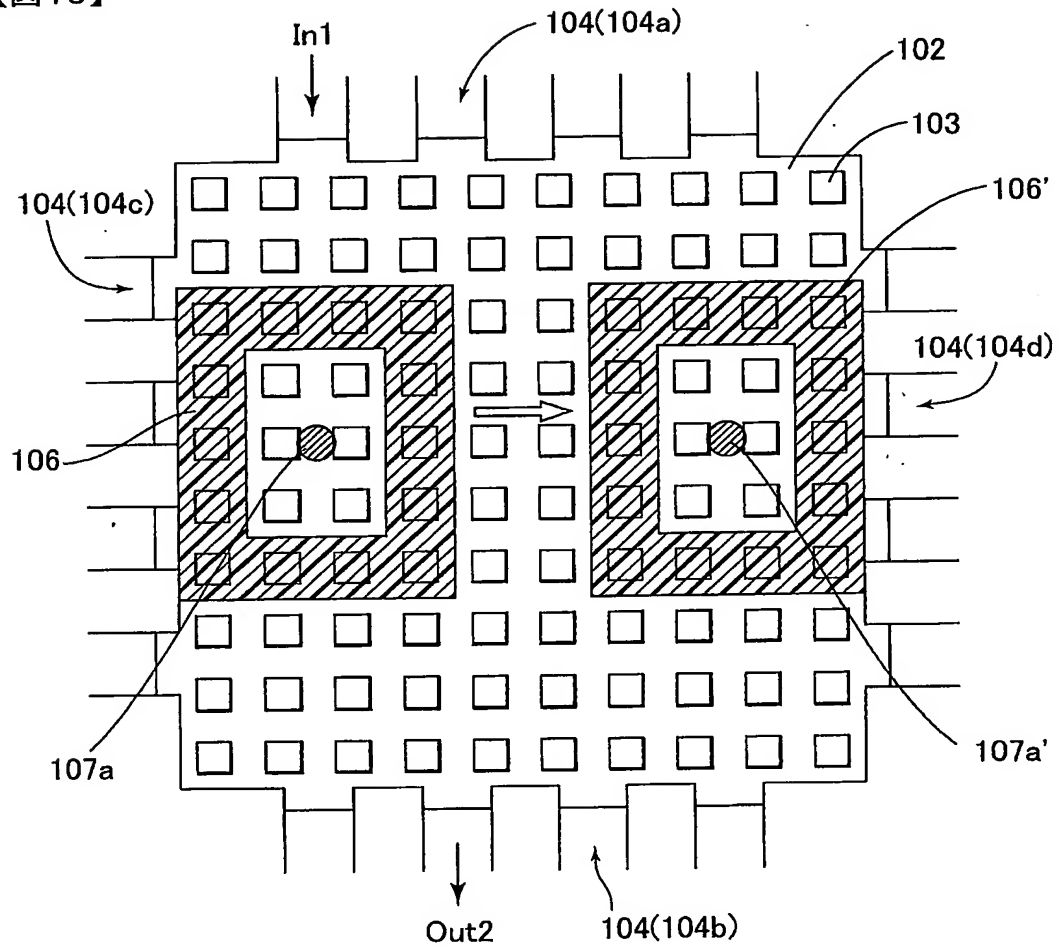


12/26

【図18】

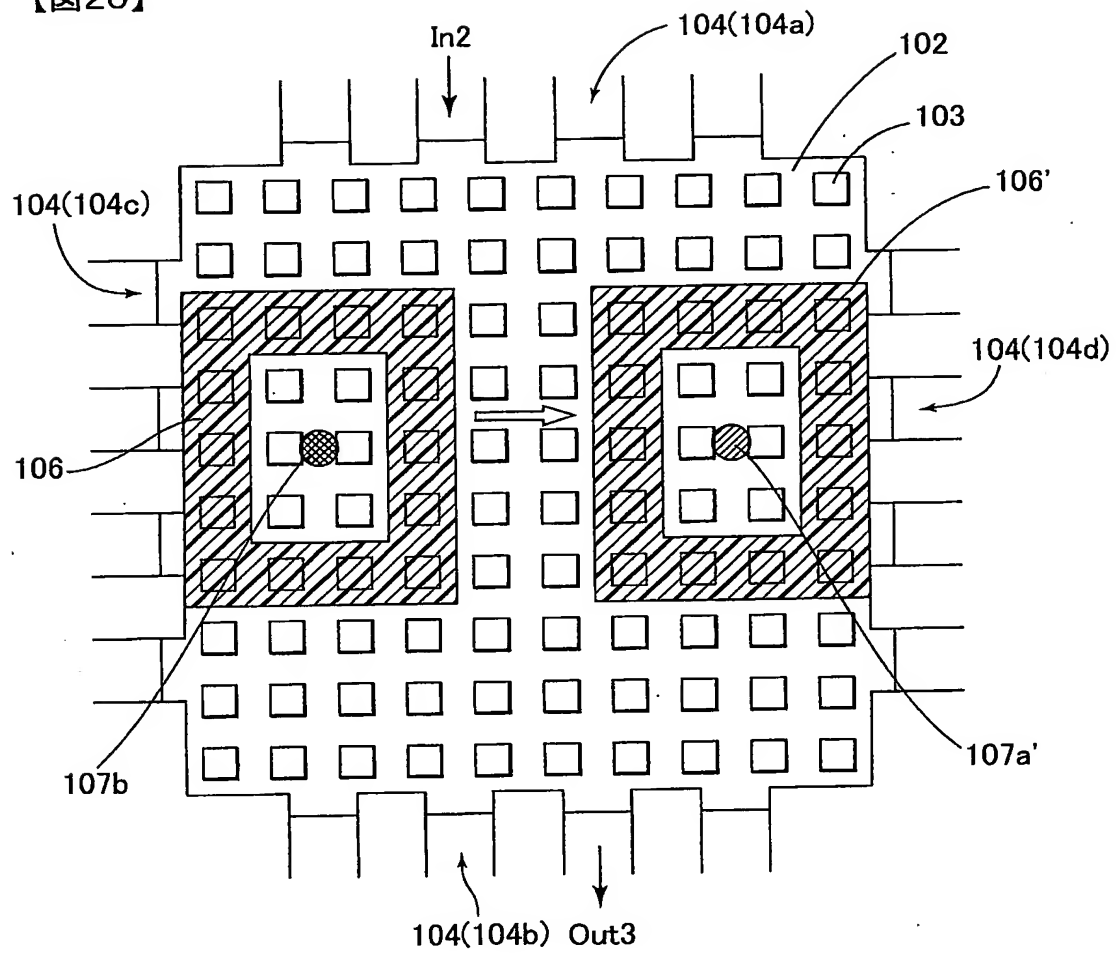


【図19】

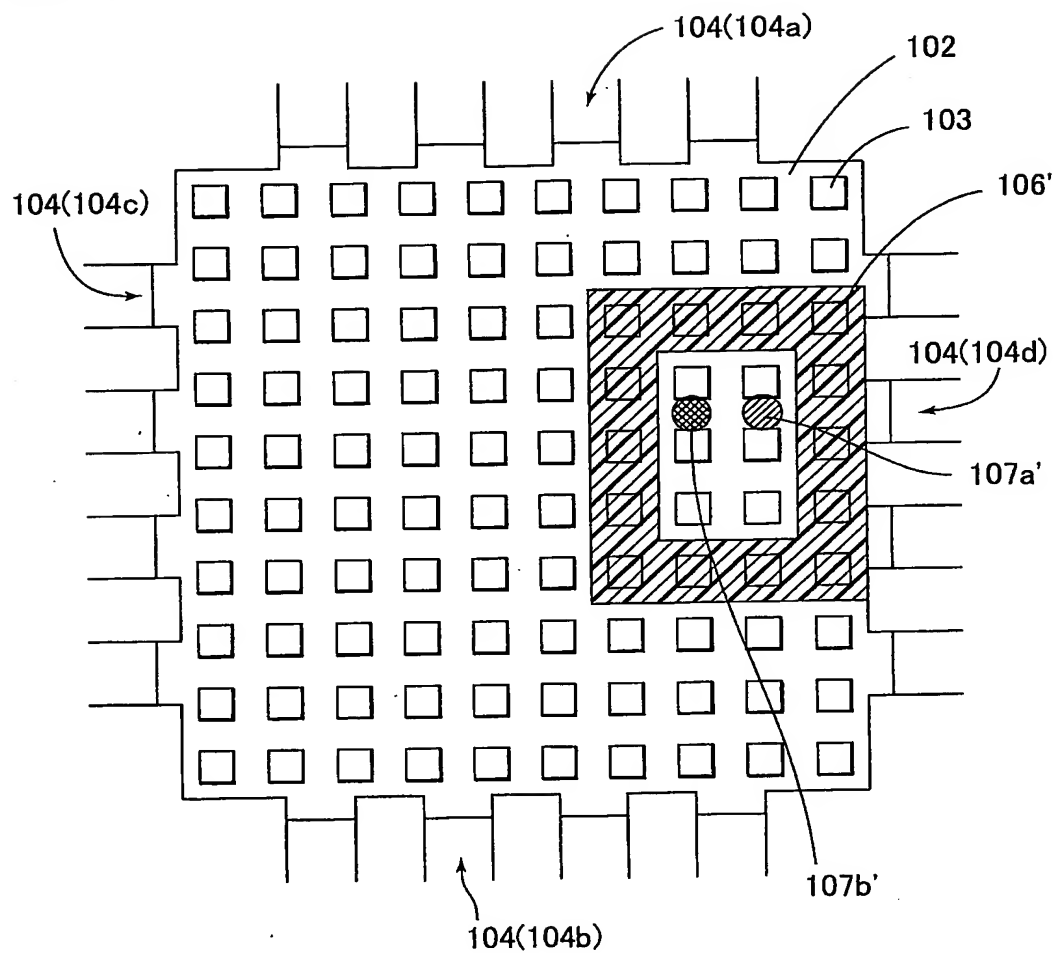




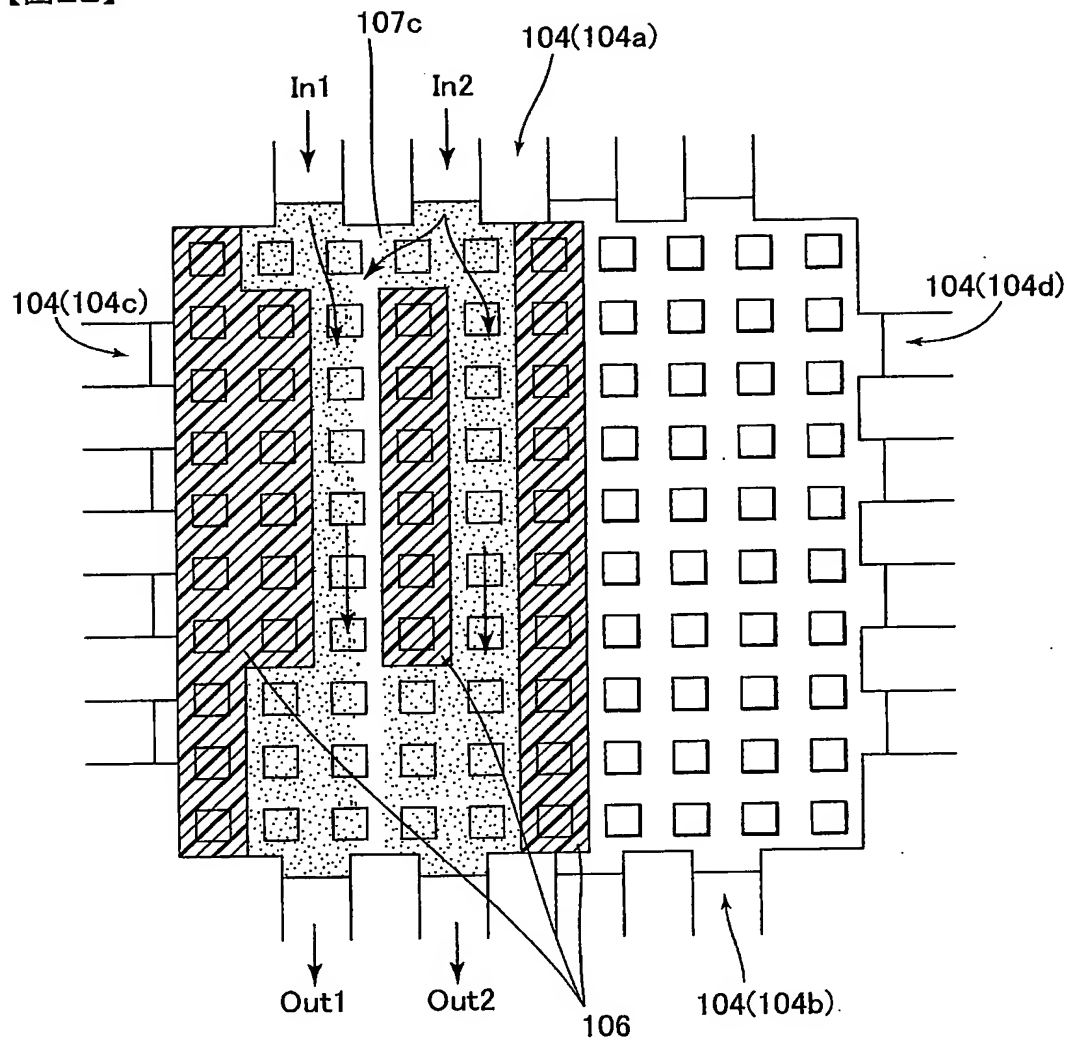
【図20】



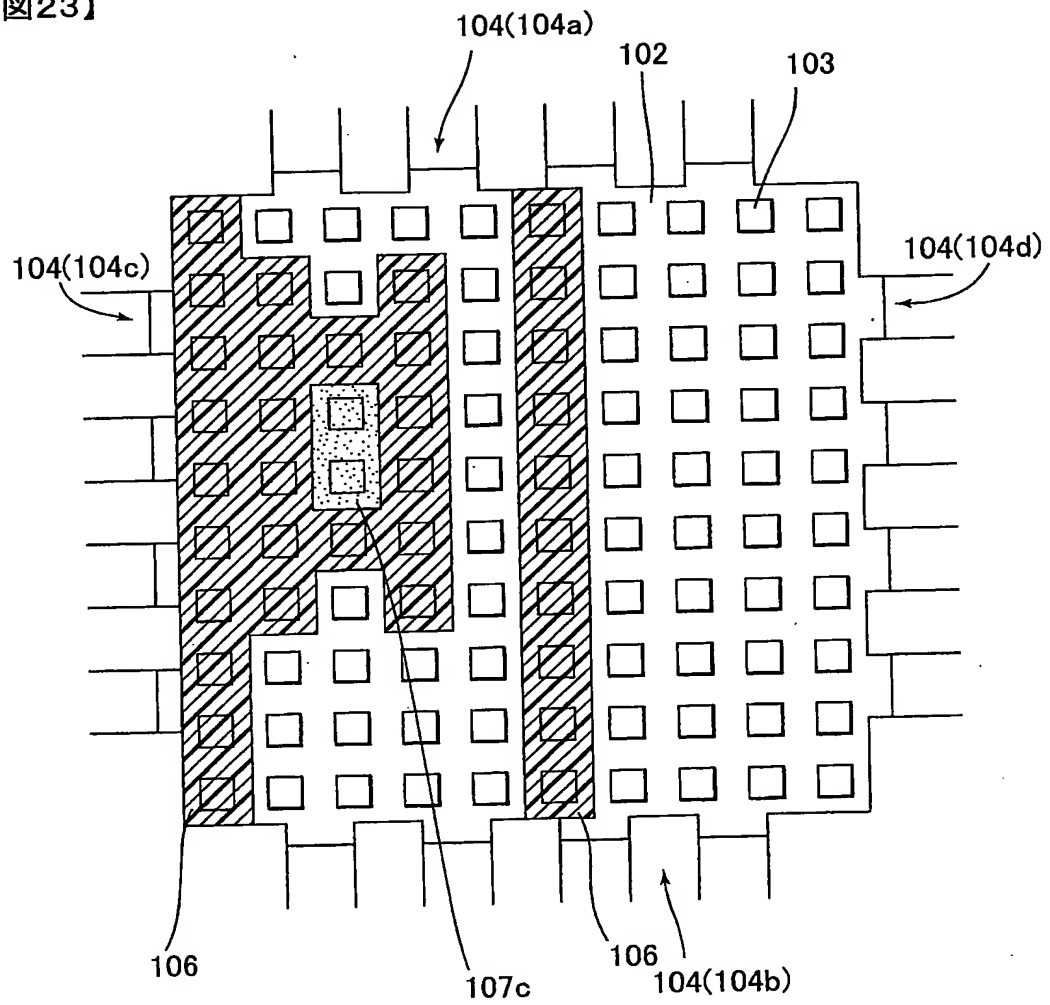
【図21】



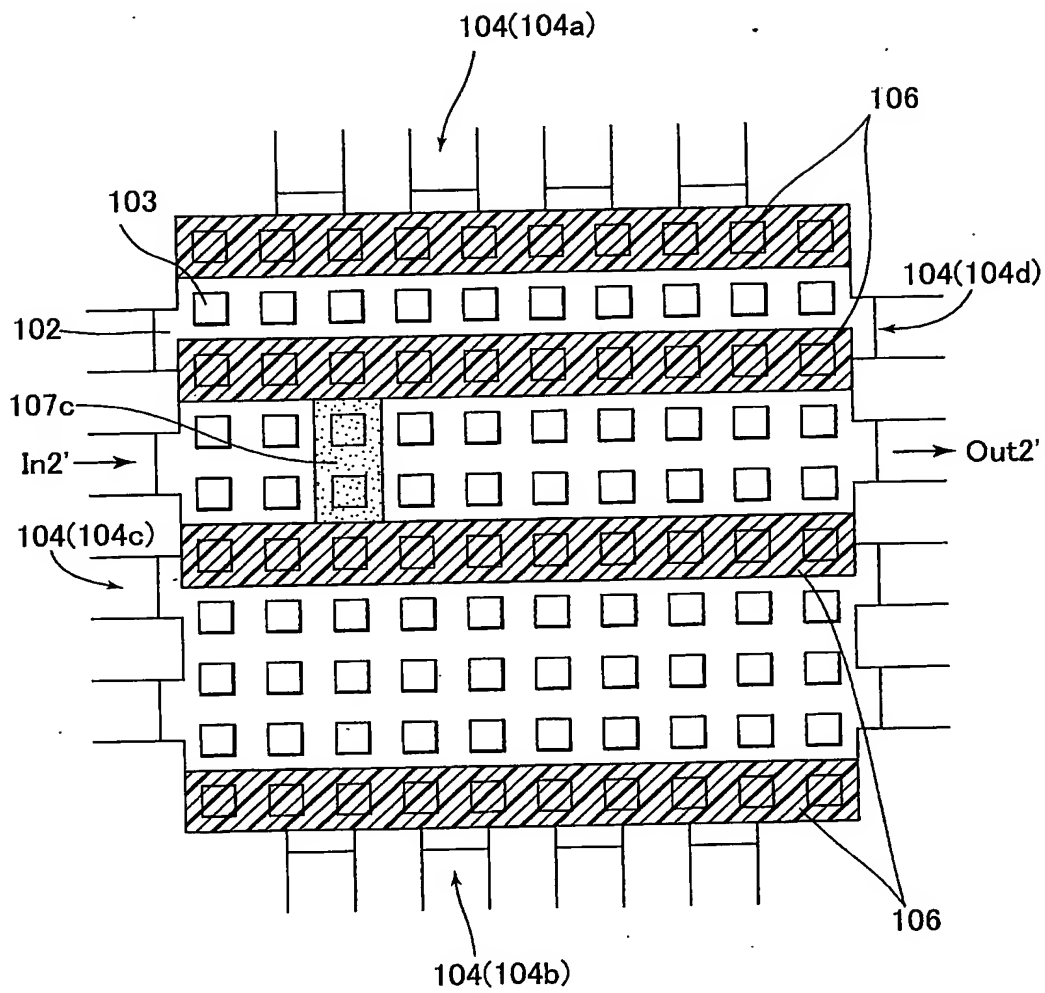
【図22】



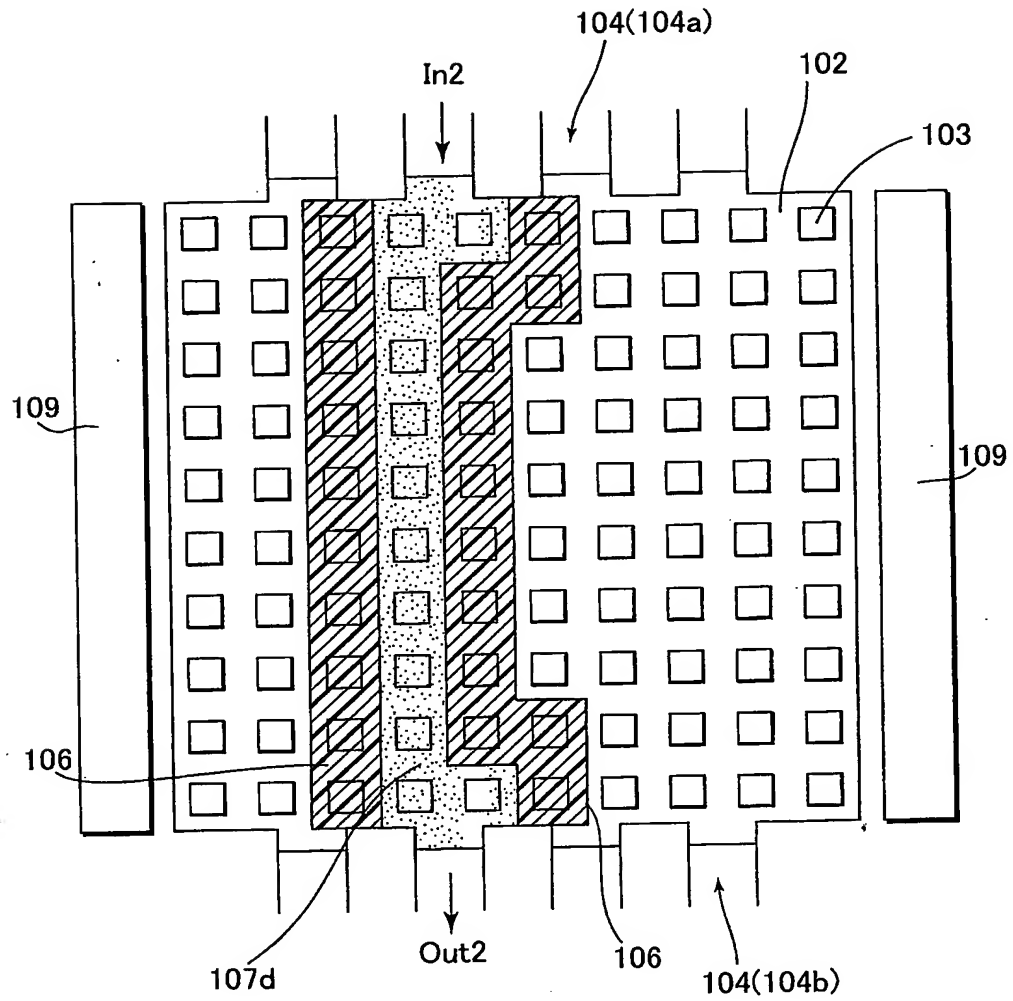
【図23】



【図24】

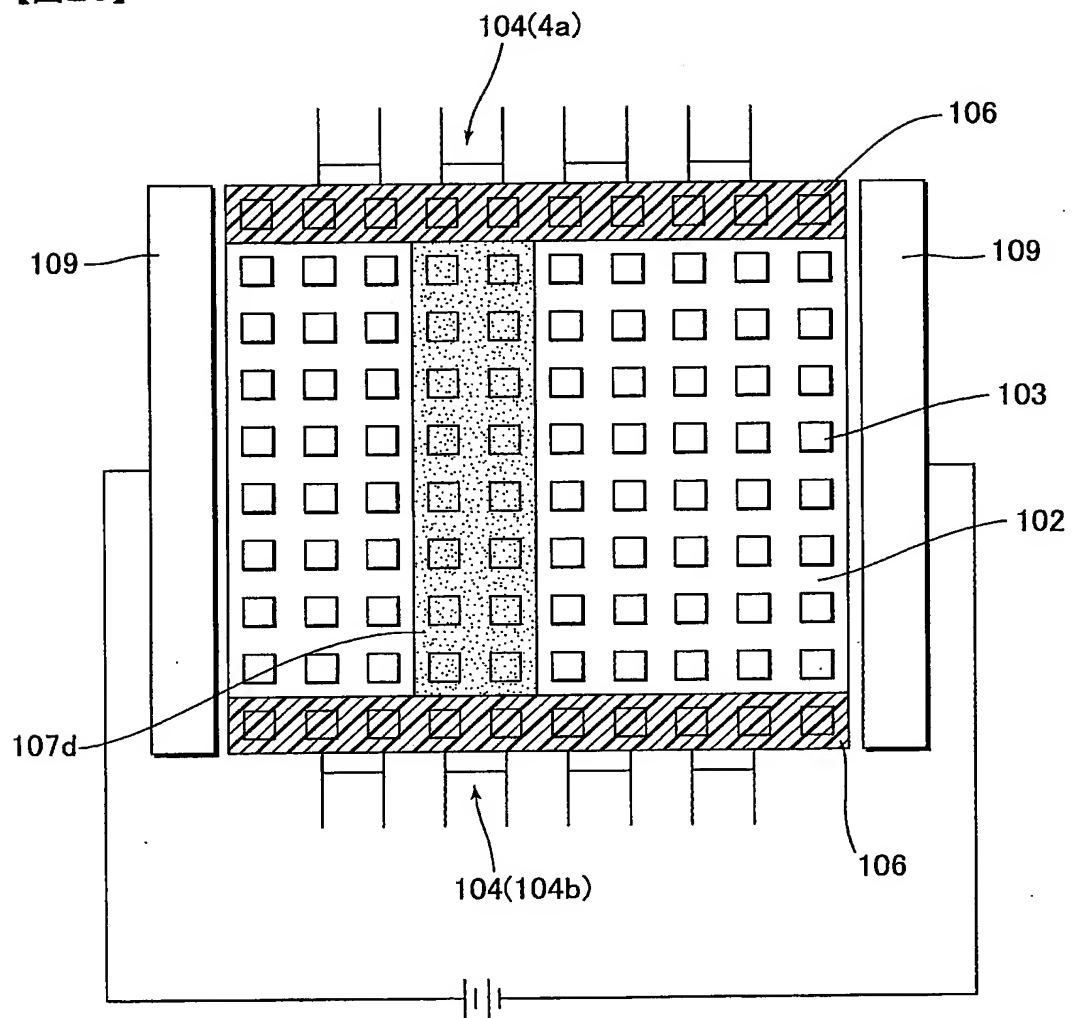


【図25】

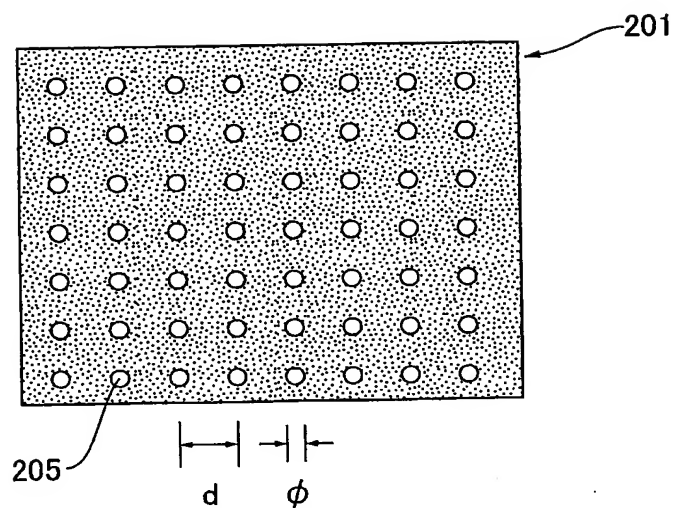


20/26

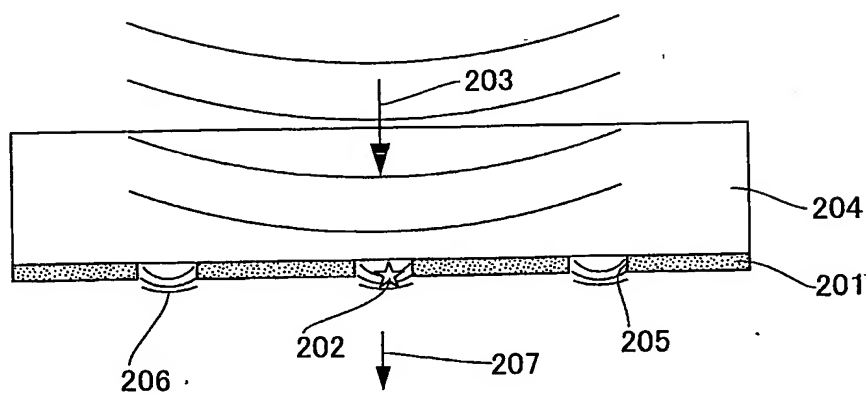
【図26】



【図 27】



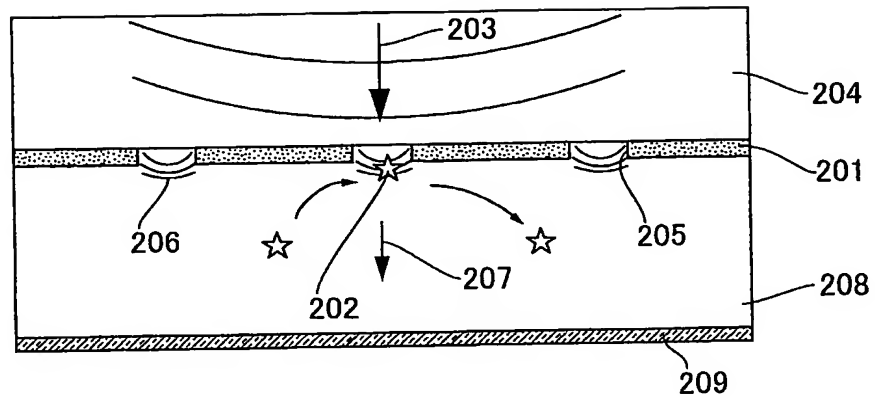
【図 28】



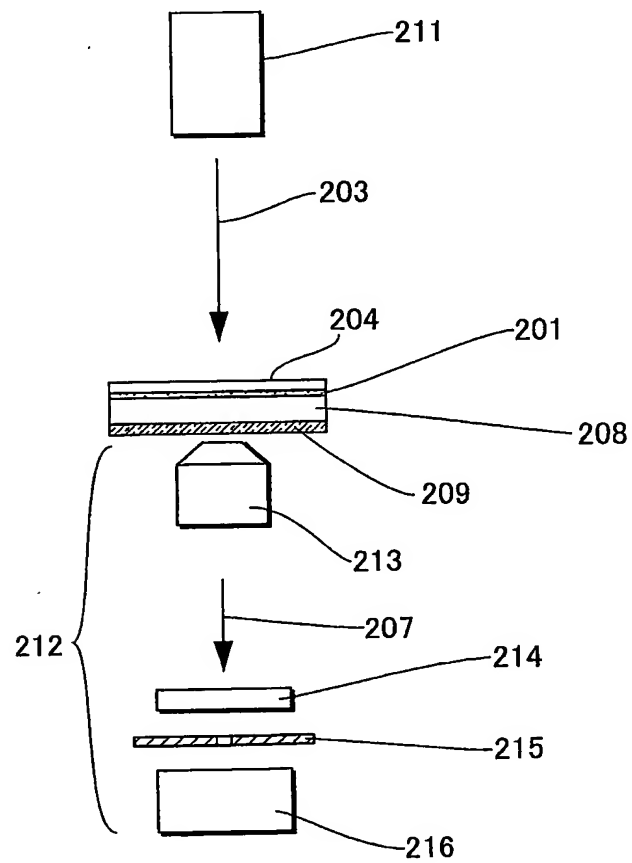


22/26

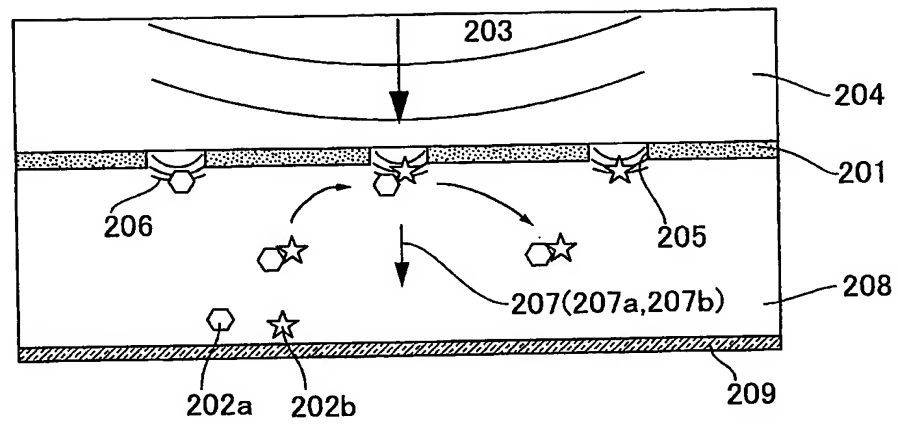
【図 29】



【図 30】

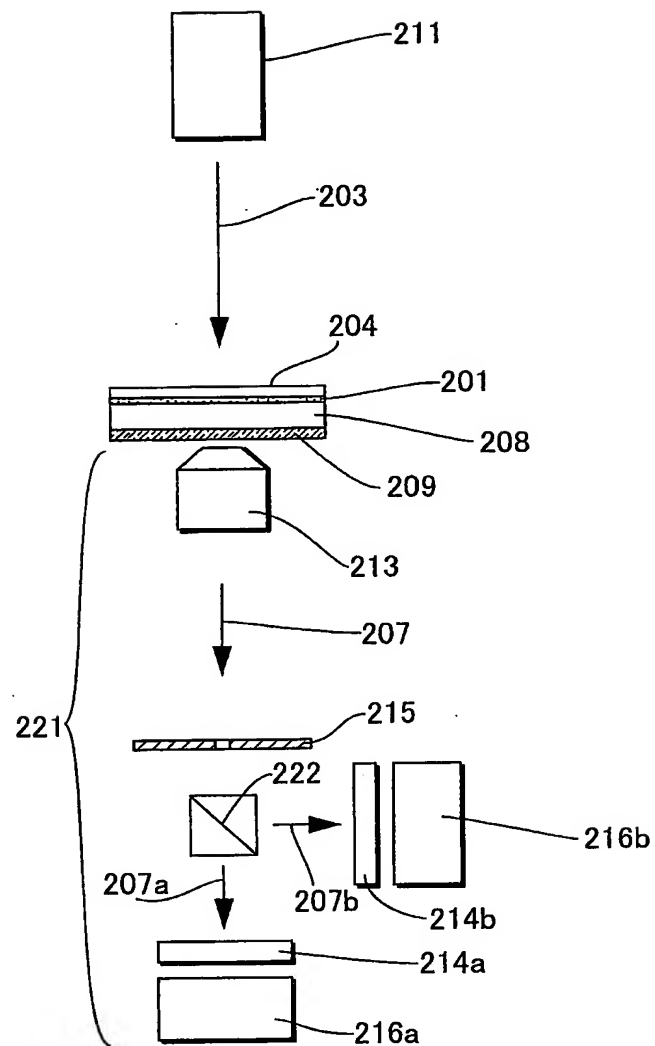


【図 31】



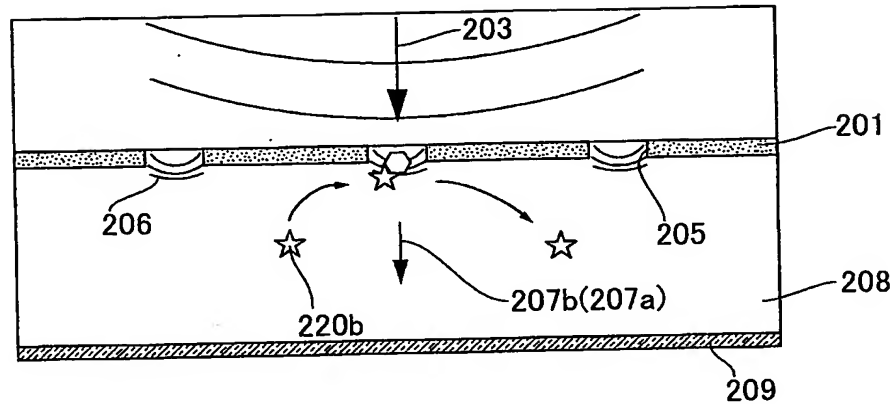
24/26

【図 32】

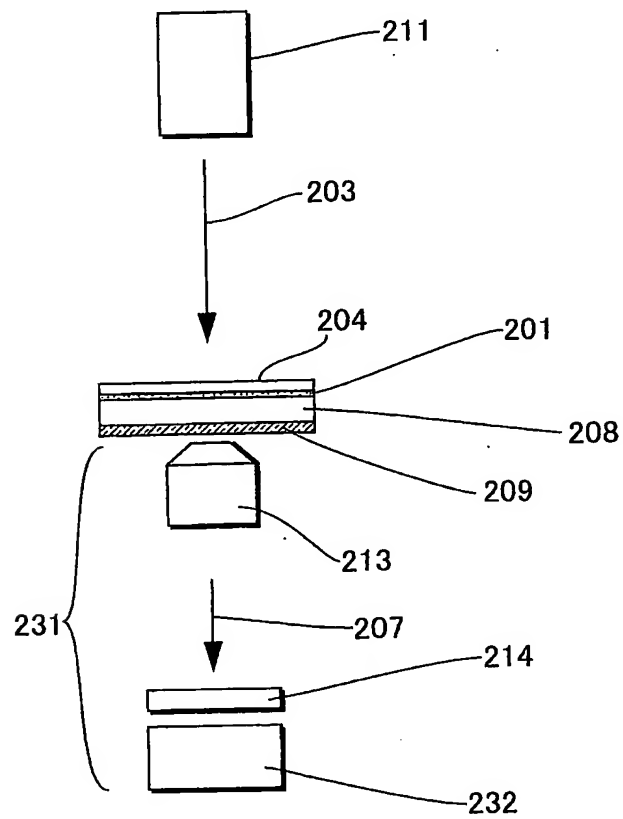


25/26

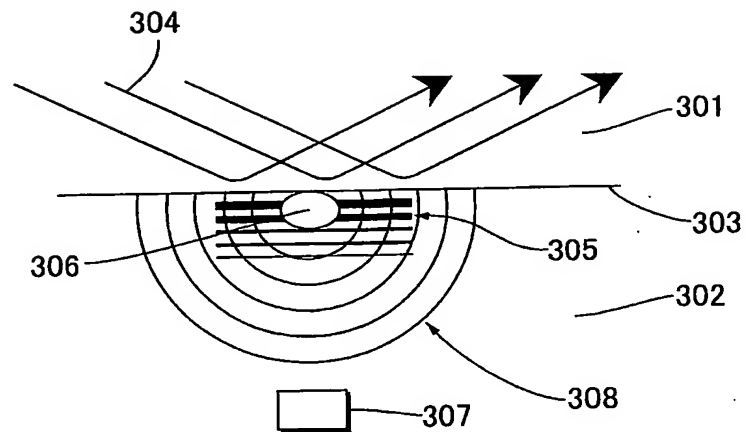
【図 33】



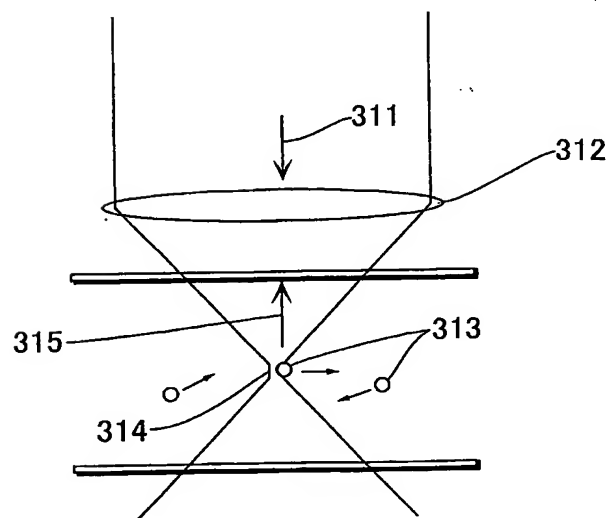
【図 34】



【図 35】



【図36】



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/13902

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> G05D7/06, G01N35/08, G01N37/00, B81B7/02, F16K31/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> G05D7/00-7/06, G01N35/08, G01N37/00, B81B7/02, F16K31/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2003
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2003	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2003

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2002-163022 A (Japan Science and Technology Corp.), 07 June, 2002 (07.06.02), Page 3, left column, line 16 to page 4, left column, line 31; Fig. 1 & WO 02/44823 A1	1-17
Y	JP 2002-215341 A (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)), 31 July, 2002 (31.07.02), Page 2, right column, line 21 to page 3, right column, line 4; Figs. 1, 2 (Family: none)	1-17

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
05 January, 2004 (05.01.04)

Date of mailing of the international search report  
20 January, 2004 (20.01.04)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/13902

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 62-101974 A (Borg-Warner Industrial Products Inc.), 12 May, 1987 (12.05.87), Page 1, lower left column, line 5 to page 3, lower left column, line 10 & AU 6256386 A & DE 3674139 D & FI 864252 A & EP 220531 A2 & ZA 8607396 A & CN 86106617 A & IN 167664 A & CA 1282476 A & IL 80053 A & KR 9403021 B & US 4691276 A1	1-17
Y	JP 61-160588 A (Matsushita Electric Industrial Co., Ltd.), 21 July, 1986 (21.07.86), Page 1, lower left column, lines 5 to 16 (Family: none)	1-17
Y	JP 58-106363 A (Matsushita Electric Industrial Co., Ltd.), 24 June, 1983 (24.06.83), Page 1, lower left column, lines 5 to 17 (Family: none)	1-17
Y	JP 61-200843 A (Kabushiki Kaisha Keihin Seiki Seisakusho), 05 September, 1986 (05.09.86), Page 2, lower left column, line 18 to page 3, lower right column, line 9 (Family: none)	1-17
Y	JP 11-44647 A (Hewlett-Packard Co.), 16 February, 1999 (16.02.99), Page 1, left column, lines 2 to 37; page 4, right column, line 6 to page 5, right column, line 5; Figs. 1 to 5 & DE 19731479 A1 & US 5812272 A1	18-37
Y	JP 2001-185472 A (NEC Corp.), 06 July, 2001 (06.07.01), Page 2, left column, lines 2 to 20 & TW 487962 B & CN 1302081 A & US 2001/16292 A1	18-37
Y	JP 2000-314955 A (Canon Inc.), 14 November, 2000 (14.11.00), Page 2, left column, lines 2 to 29; page 3, right column, line 18 to page 4, right column, line 28; Figs. 1 to 3 (Family: none)	18-37

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP03/13902

**C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2000-321756 A (Canon Inc.), 24 November, 2000 (24.11.00), Page 2, left column, lines 2 to 38 (Family: none)	18-37



## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP03/13902

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> G05D7/06, G01N35/08, G01N37/00, B81B7/02,  
F16K31/02

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> G05D7/00-7/06, G01N35/08, G01N37/00,  
B81B7/02, F16K31/02

## 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2003年
日本国登録実用新案公報	1994-2003年
日本国実用新案登録公報	1996-2003年

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 2002-163022 A (科学技術振興事業団) 2002.06.07、 第3頁左欄第16行~第4頁左欄第31行、図1 & WO 02/44823 A1	1-17
Y	JP 2002-215341 A (独立行政法人産業技術総合研 究所) 2002.07.31、 第2頁右欄第21行~第3頁右欄第4行、図1, 2 (ファミリーなし)	1-17

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
- 「O」 口頭による開示、使用、展示等に関する文献
- 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

05.01.04

国際調査報告の発送日

20.1.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)  
郵便番号100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

森林 克郎

3H

8613

電話番号

03-3581-1101 内線 3314

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 62-101974 A (ボーグ・ワーナー・インダストリアル・プロダクツ・インコーポレーテッド) 1987. 05. 12、 第1頁左下欄第5行～第3頁左下欄第10行 & AU 6256386 A & DE 3674139 D & FI 864252 A & EP 220531 A2 & ZA 8607396 A & CN 86106617 A & IN 167664 A & CA 1282476 A & IL 80053 A & KR 9403021 B & US 4691276 A1	1-17
Y	JP 61-160588 A (松下電器産業株式会社) 1986. 07. 21、 第1頁左下欄第5～16行 (ファミリーなし)	1-17
Y	JP 58-106363 A (松下電器産業株式会社) 1983. 06. 24、 第1頁左下欄第5～17行 (ファミリーなし)	1-17
Y	JP 61-200843 A (株式会社京浜精機製作所) 1986. 09. 05、 第2頁左下欄第18行～第3頁右下欄第9行 (ファミリーなし)	1-17
Y	JP 11-44647 A (ヒューレット・パカード・カンパニー) 1999. 02. 16、 第1頁左欄第2～37行、第4頁右欄第6行～第5頁右欄第5行、 図1～5 & DE 19731479 A1 & US 5812272 A1	18-37
Y	JP 2001-185472 A (日本電気株式会社) 2001. 07. 06、 第2頁左欄第2～20行 & TW 487962 B & CN 1302081 A & US 2001/16292 A1	18-37
Y	JP 2000-314955 A (キャノン株式会社) 2000. 11. 14、 第2頁左欄第2～29行、第3頁右欄第18行～第4頁右欄第28 行、図1～3 (ファミリーなし)	18-37
Y	JP 2000-321756 A (キャノン株式会社) 2000. 11. 24、 第2頁左欄第2～38行 (ファミリーなし)	18-37

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☒ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**